

Aus der Klinik und Poliklinik für Zahn-, Mund- und Kieferkranke
der Justus Liebig-Universität Gießen

Poliklinik und zahnärztlich chirurgische Abteilung

Vorsteher: Prof. Dr. H. Kirschner

Tierexperimentelle autoradiographische Untersuchungen über die Regeneration der Gingiva

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der
Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der
Justus Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Eckard Rühl

1971

Aus der Klinik und Poliklinik für Zahn-, Mund- und Kieferkranke
der Justus Liebig-Universität Gießen
Poliklinik und zahnärztlich chirurgische Abteilung

Vorsteher: Prof. Dr. H. Kirschner

**Tierexperimentelle autoradiographische
Untersuchungen über die Regeneration
der Gingiva**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der
Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der
Justus Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Eckard Rühl

1971



Dekan: Prof. Dr. H. G. Lasch
Referent: Prof. Dr. H. Kirschner
Correferent: Prof. Dr. J. Kracht

INHALT

A. Einleitung

B. Methode

1. Tiermaterial und Haltung
2. Applikation von ^3H -Thymidin
3. Autoradiographische Technik und Auswertung
der Autoradiogramme

C. Morphologische Studien an der Molarengingiva der Maus

D. Ergebnisse

I. Zellneubildung

1. Tiergruppe I (Hartfutter)
 - a. "Epitheliales Attachment"
 - b. "Downgrowing Epithel"
 - c. "Outer Gingival Epithel"
2. Tiergruppe II (Weichfutter)
 - a. "Epitheliales Attachment"
 - b. "Downgrowing Epithel"
 - c. "Outer Gingival Epithel"
3. Varianzanalytische Untersuchungen

II. Zellmigration

1. "Epitheliales Attachment"
2. "Downgrowing Epithel"

E. Besprechung der Ergebnisse

F. Zusammenfassung

G. Literatur

A. Einleitung

Zur Bestimmung der Regenerationszeiten verschiedener proliferierender Gewebe ist in den letzten Jahren vermehrt die autoradiographische Technik angewandt worden. Der Fortschritt ist in erster Linie auf die Möglichkeit radioaktiver Markierung organischer und anorganischer Substanzen zurückzuführen. Mit Hilfe der Histoautoradiographie kann die Regeneration von Epithelgewebe sehr genau beobachtet werden.

Wie die Forschungsarbeiten in Tab. 1 zeigen, ist parodontales Epithelgewebe wiederholt untersucht worden. Es liegen Ergebnisse über Zellvermehrung und Zellmigration in der Gingiva vor. Systematische Untersuchungen werden vermißt. Die Arbeiten von KIRSCHNER (1967 a, b, 1968) haben gezeigt, daß die Zellproliferation und damit die Erneuerungszeit des Epithelgewebes der Mundschleimhaut eines Tieres von Abschnitt zu Abschnitt statistisch signifikant unterschiedlich ist.

Nachfolgende Untersuchungen sind mit ^3H -Thymin an Mäusen vorgenommen worden. Thymin ist ein Vorläufer der DNS und wird von der in Teilungsvorbereitung befindlichen Zelle selektiv eingebaut.

Durch die Applikation von ^3H -Thymin werden im Autoradiogramm die Zellen erfasst, die sich zum Zeitpunkt der Injektion in der DNS-Synthesephase oder kurz davor befinden. Außerdem kann die einmal markierte Zelle bei entsprechender Versuchsanordnung weiter verfolgt werden; dies gilt insbesondere für die postmitotische, differenzierte Zelle, die keinem Stoffumsatz mehr unterliegt. Daneben besteht die Möglichkeit zu einer zeitlich begrenzten Beobachtung markierter Zellen, die sich erneut auf die Teilung vorbereiten. Es entfallen je 50% der markierten Substanz auf die entstehenden zwei Tochterzellen.

LEBLOND und Mitarbeiter (1959), SCHULZE und OEHLERT (1960) und WALKER (1960) haben aufgrund umfangreicher autoradiographischer Bestimmungen eine Einteilung in

1. Renewing cell populations
2. Expanding cell populations und
3. Static cell populations

(schnell, langsam und nicht proliferierende Systeme) getroffen. Das Epithel des Verdauungstraktes erneuert sich schnell. BEAGRIE und SKOUGAARD (1962) haben diese Einteilung ebenfalls übernommen und geben als Kriterium für ein Wechselgewebe folgendes an:

1. radioaktiver Index $>0,3$
2. Zunahme der markierten Zellen in den ersten 24 Stunden
3. Abnahme markierter Zellen zwischen dem 3. und 6. Tag.

Das Ziel dieser Arbeit ist eine systematische Untersuchung der Regeneration von Gingivaepithel der Maus. Zellneubildung und Zellmigration sollen zunächst unter physiologischen Bedingungen geprüft werden. Im Hinblick auf eine mögliche Beeinflussung der Zellproliferation durch die Nahrungskonsistenz ist im Parallelversuch die Applikation von Weichfutter vorgesehen.

<u>Art der Untersuchung</u>	<u>Tier u. Areal</u>	<u>Literatur</u>
Zellneubildung (³ H-Index) u. Zellmigration	Ratte Gingiva d. Incisivi	ANDERSON, G.S. STERN, I.B. (1961)
Zellneubildung (³ H-Index) unter Östrogeneinfluß	Maus Molarengingiva	BEAGRIE, G.S. (1966)
Zellneubildung (³ H-Index) Zellmigration u. Gewebsregeneration	Maus u. Affe Molarengingiva	BEAGRIE, G.S. (1963)
Zellmigration u. Gewebsregeneration	Maus Molarengingiva	BEAGRIE, G.S. SKOUGAARD, M.R.
Zellneubildung (³ H-Index), Zellmigration u. Gewebsregeneration	Maus Molarengingiva	BEAGRIE, G.S. SKOUGAARD, M.R. (1962)
Zellneubildung (³ H-Index)	Maus Molarengingiva	GREULICH, R.C. (1961)
Zellneubildung (³ H-Index) u. Zellmigration	Maus Molarenregion Interdentalpapille	JOGLEKAR, A.A. TOTO, P.D. GARGIULO, A.W. (1964)
Zellneubildung (Colchizinmethode) mitot. Aktivität in Abhängigkeit von Adrenalin	Ratte Molarengingiva	HANSEN, E.R. (1967)
Zellneubildung (Colchizinmethode) mitot. Aktivität in Abhängigkeit vom Alter	Ratte Molarengingiva	HANSEN, E.R. (1966)
24-Stden-Periodik der mitotischen Aktivität bei Tag- u. Nachttieren (Rundzelleninfiltration)	Ratte Molarenregion Interdentalpapille	HARTL, St. (1956)

Zellneubildung (Mitosen) u. Proliferation	Ratte Molarenregion Interdentalpapille	HIRTH, Ch.M. HARTL, St. MÜHLEMANN, H.R. (1955)
Zellneubildung (³ H-Index) u. Zellproliferation	Maus Molarengingiva	KIRSCHNER, H. (1968)
Zellneubildung (³ H-Index) Zellmigration u. Gewebsregeneration	Maus Molarengingiva	KIRSCHNER, H. RÜHL, E. (1969)
Zellneubildung (Mitosen) mitot. Aktivität bei Tag- und Nacht- tieren (Rundzelleninfiltration)	Ratte Molarenregion Interdentalpapille	MÜHLEMANN, H.R. HARTL, S. (1955)
Zellneubildung (Colchizimethode) Tag- Nachtrhythmus	Ratte Molarengingiva	TROTT, J.R. GORENSTEIN, S.L. (1963)
Zellneubildung (Colchizimethode) mitot. Aktivität Abhängigkeit von Östrogen	Ratte, weibl. Molarengingiva	YOUNG, G.W. (1968)
Zellneubildung (Mitosen) in Abhängigkeit von Alter und Entzündungszustand	Mensch Gingiva	MEYER, J. MARWAH, A.S. WEINMANN, J.P. (1956)

B. Methode

1. Tiermaterial und Haltung

Die Untersuchungen wurden an 66 männlichen Mäusen des Stammes BLH durchgeführt. Das Alter der Tiere betrug im Durchschnitt 60 Tage. Diese Tiere gelten als geschlechtsreif aber noch nicht als ausgewachsen.

Nach einer Eingewöhnungszeit von ca. 14 Tagen wurden die Tiere in den Versuch genommen. Die Umweltbedingungen waren gleichbleibend, d.h. die Raumtemperatur betrug $+ 22^{\circ} \text{C}$ ($\pm 1,8^{\circ} \text{C}$), die Luftfeuchtigkeit zwischen 60 u. 70%.

Eine Gruppe von Mäusen (18 Tiere = Gruppe I) wurde mit pelettiertem Hartfutter und Trinkwasser ad libitum zu verschiedenen Tageszeiten gefüttert (Altromin Standardkost für Ratte und Maus B 0102, $\emptyset$ 4,5).

Die zweite Tiergruppe (18 Tiere = Gruppe II) erhielt die gleiche Kost in Pulverform (60 mesh) und Trinkwasser ad libitum.

20 Mäuse (Tiergruppe III) fanden in einem weiteren Versuch Verwendung; es wurde pelettiertes Hartfutter (Altromin Standardkost für Ratte und Maus B 0102, $\emptyset$ 4,5) verfüttert und Trinkwasser ad libitum gegeben. Alle Tiere wurden in Kunststoffklarsichkästen mit Holzgranulateinstreu ohne Ortwechsel (Lage zum Fenster) gehalten und in etwa 4-tägigem Abstand gewogen.

Die Experimente mit den Tiergruppen I und II fanden an gleichen Tagen im Monat Januar statt; die Untersuchungen der Gruppe III im Februar/März.

2. Applikation von ^3H -Thymidin

Die Mäuse der Gruppe I und II erhielten ^3H -Thymidin (spez. Aktivität 3 C/mMol) $1 \mu\text{C/g}$ Maus i.p. injiziert, so daß zu 6 verschiedenen Tages-Nachtzeiten jeweils aus jeder Gruppe 3 Mäuse Thymidin erhielten und 40 Min. nach der Applikation getötet wurden.

So ergaben sich aus der Gruppe I und II je 6 Untergruppen mit jeweils 3 Tieren verteilt auf die Zeiten 12⁰⁰, 16⁰⁰, 20⁰⁰, 24⁰⁰, 4⁰⁰, 8⁰⁰ Uhr. Mäuse der Gruppe III erhielten eine einmalige Dosis ³H-Thymidin zu derselben Zeit (8⁰⁰ Uhr) und wurden in Intervallen zwischen 1 Std. und 120 Stden. getötet (1, 4, 6, 8, 12, 14, 16, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 92, 102, 120 Stunden).

Die Tötung der Tiere erfolgte in milder Äthernarkose. Die vom Fell befreiten Köpfe wurden sofort in gepuffertes Formalin eingelegt und bis zur Paraffineinbettung nach den bekannten histologischen Grundregeln weiterbehandelt. Die Entkalkung erfolgte einheitlich in Titriplex III über ca. 25 Tage.

In Frontalserienschnitten (3-5 μ) wurde die gesamte Molarenregion (M1 - M3) dargestellt. Für die Autoradiographie kam etwa jeder 8 - 10 Schnitt zur Auswertung. Um die verschiedenen Gewebe besser darzustellen, hat sich eine Mehrfachfärbung mit dem Farbstoff Cölestin, Hämalan, Erythrosin, Safran und Alciangrün bewährt (CHESA-Färbung, BURCK 1965).

Die Autoradiogramme wurden durch die Filmemulsion hindurch mit Hämalan (n.P. MEYER) gefärbt.

3. Autoradiographische Technik und Auswertung der Autoradiogramme

Nach dem Verfahren von JOFTES und WARREN (1955) und JOFTES (1959) wurden die Objektträger mit sorgfältig entparaffinierten Schnitten bei Ilford S-Safelight mit verflüssigter Kernspur-Fotoemulsion (K2, Ilford) durch Eintauchen beschichtet, kurz getrocknet und in lichtdichter Box im Kühlschrank bei +4° bis +8° C ca. 20 Tage exponiert.

Die Expositionszeit kann empirisch und rechnerisch ermittelt werden. Durch Probeabsetzen einiger Autoradiogramme ist es

am ehesten möglich, eine optimale Kontrastierung ohne störenden Nulleffekt zu erreichen. Bei dem angestrebten Vergleich der Ergebnisse einzelner Tiergruppen ist eine exakte Aufarbeitung der zu vergleichenden Gewebe äußerst wichtig (KIRSCHNER, 1968).

Der Entstehung eines Autoradiogrammes liegt der von GARNEY und MOTT (1938) beschriebene photographische Vorgang zugrunde.

Ionisierende β -Strahlung trifft aus dem Gewebe auf Silberbromid in der dicht über dem Gewebsabschnitt haftenden Photoschicht. Durch den Entwicklungsprozeß werden die bestrahlten Bereiche sichtbar gemacht. Im mikroskopischen Bild können die Silberkörnchen in der Filmschicht den Aktivitätszentren im Gewebe (hier den Zellkernen) zugeordnet werden. Technische Einzelheiten finden sich bei SCHMEISER (1963). Neben dem zu erwartenden Schwärzungseffekt treten in der Filmschicht Silvergrains auf, die als "Nulleffekt" oder "Background" bezeichnet werden und weniger durch atmosphärische Strahlung als durch Fehler beim Experimentieren hervorgerufen werden (ROGERS 1967). Nimmt dieser Nulleffekt Überhand, ist die Aussagekraft der betroffenen Autoradiogramme wertlos. In eigenen Voruntersuchungen konnten Fehlerquellen weitgehend eliminiert werden, so daß im Hauptversuch eine eindeutige Interpretation gewährleistet war.

C. Morphologische Studien an der Gingiva der Maus

Betrachtet man die Gingiva im Molarenbereich der Maus bei etwa 10-facher binocularer Vergrößerung im Auflicht, so stellt sie sich als leichter Wulst dar, der im buccalen Bereich stärker hervortritt. Frontalserienschnitte im Molarenbereich lassen bei mikroskopischer Betrachtung drei morphologisch differente Unterabschnitte erkennen (Abb. 1,2, u. 3):

1. "Epitheliales Attachment" - EA
2. "Downgrowing Epithel" - DE
3. "Outer Gingival Epithel" - OGE

Diese Einteilung wird in Abb. 3 mit Hilfe eines Überfallblattes dargestellt. Meine autoradiographischen Auswertungen basieren auf dieser Einteilung. Die angloamerikanische Nomenklatur wurde gewählt, da sie die zum Menschen anatomisch differenten Verhältnisse besser wiedergibt.

Ein wesentlicher Unterschied zur menschlichen Gingiva besteht in der keilförmigen Ausbildung des "Attachment" bei der Maus. Beim Menschen handelt es sich in vergleichbarer Region um einen Epithelsaum von ca. 1-6 Zellreihen (MEYER, MARWAH, WEINMANN, 1956).

DE und OGE der Maus sind kompakt keratinisiert. An der Papillenspitze, der Grenze des OGE und DE, verdickt sich das Stratum corneum zu einem aufgelockerten, unregelmäßig strukturierten Verband (Abb. 3). Dieser Teil der Gingiva überlappt in der Regel den pyknotischen Zellverband der Papillenspitze des EA.

Die Zellen im "Attachment" sind überwiegend polymorphkernig und weniger kompakt zusammengelagert als in anderen Gingivaabschnitten und der Oralmucosa. Am Schmelz lagern lange, flache Zellen. Mit ihrer Längsachse liegen sie parallel zur Schmelzoberfläche.

Eine feine aber deutlich kompakte Keratinschicht zieht sich zwischen DE und EA in die Tiefe. In den Serienschnitten wurde erkannt, daß die Verhornung fast ausschließlich eine Leistung

des DE darstellt. Im EA reicht das Stratum spinosum bis an die EA und DE trennende Keratinschicht heran. Ein Stratum granulosum ist nur im DE eindeutig festzustellen (Abb. 4 u. 5). Es wird daher vermutet, daß der Aufbau dieser Hornschicht überwiegend eine Leistung des DE darstellt. Es kann andererseits eine Beteiligung des EA nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Abrißstellen der Keratinschicht (Abb. 5), die eine Zugehörigkeit zum EA vermuten lassen, täuschen mit großer Wahrscheinlichkeit. Sie sind in dieser Form in anderen Mundschleimhautbereichen ebenfalls feststellbar. In meinen Untersuchungen habe ich die Verlängerung dieser Keratinisierungszone als Trennlinie zwischen DE und EA im tieferen Epithelabschnitt gewählt (Abb. 3). Die Richtigkeit dieser Einteilung konnte durch später vorgenommene Untersuchungen über die Zellmigration bestätigt werden. Auch BEAGRIE und SKOUGAARD (1963) haben in ihren Untersuchungen diese Aufteilung gewählt.

Die Epithelregion im Interdentalraum bildet bei sagittaler Schnittrichtung ein Dreieck. Dieser Gewebsbereich ist von MÜHLEMANN und HARTL (1955) und JOGLEKAR, TOTO und GARGIULO (1964) untersucht worden und wurde von mir nicht berücksichtigt.



Abb. 1: Mundhöhle der Maus (Frontalschnitt, Molarenregion
des UK, 80:1)



Abb. 2: Gingiva der Maus im Molarenbereich des UK,
lingual (240:1).

Abb. 3: Gingiva der Maus im Molarenbereich des UK (1000:1).
Gemeinsame Verhornungszone von EA und DE und
Zellneubildungszentren im EA (R_1 = Region 1,
 R_2 = Region 2).

D = Dentin

S = Schmelz

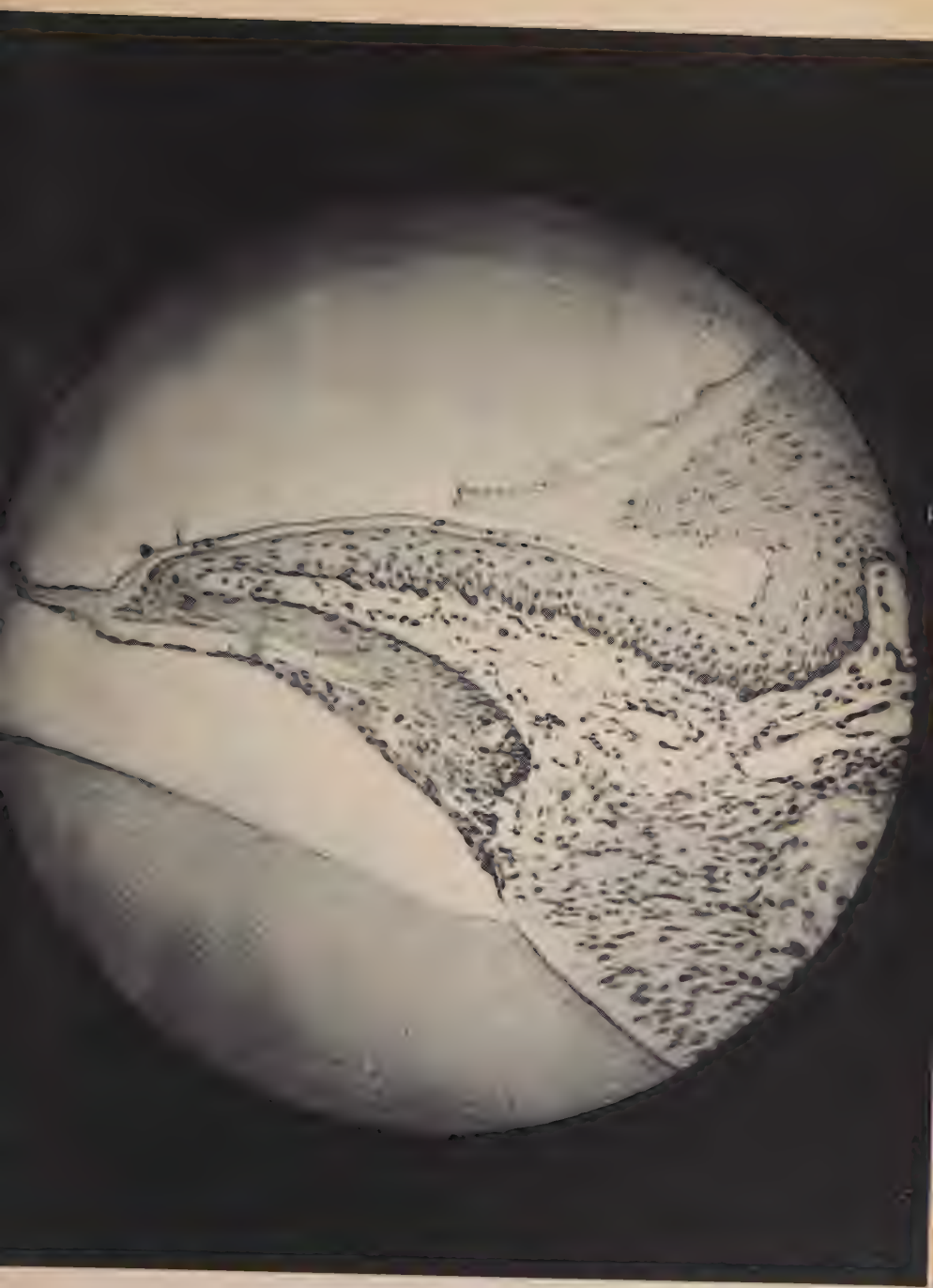
EA = Epitheliales Attachment

DE = Downgrowing Epithel

OGE = Outer Gingival Epithel







DE



EA

Abb. 4: Gingiva im Molarenbereich (Maus). Zellen des EA liegen direkt dem Stratum corneum an. Links das Stratum granulosum des DE (1000:1).

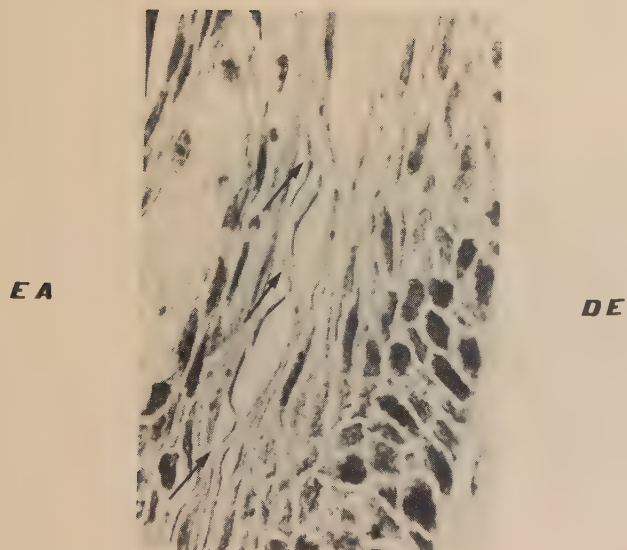


Abb. 5: Gingiva im Molarenbereich (Maus). Abrißstellen
des Stratum corneum zwischen EA und DE†(1000:1).

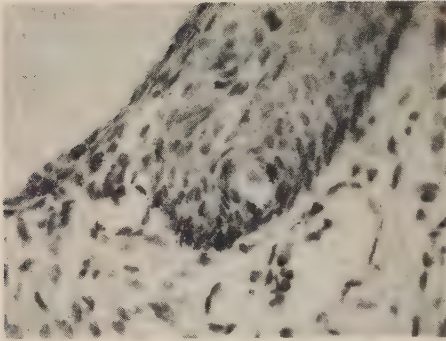


Abb. 6: Gingiva (Maus);basaler Bereich von DE und EA.

Auffallende Konzentration markierter Zellen (480:1).

D. Ergebnisse

Wie in Kapitel C beschrieben, ist die Gingiva in drei Abschnitte gegliedert worden. Diese Einteilung entspricht der morphologischen Eigenart der einzelnen Gewebsabschnitte und hat sich für die Zellneubildungs- und Migrationsuntersuchungen bewährt.

I Zellneubildung

Der ^3H -Index (Markierungsindex) gibt das Verhältnis markierter Zellen zur gezählten Gesamtzellzahl im einschichtigen Stratum basale an. Es sind dazu pro Areal und Tier 2000 Zellen gezählt worden *. Nur die Zellen wurden gewertet, die der unteren einschichtigen Zelllage des jeweiligen Epithelabschnittes zugeordnet werden konnten.

In der Mundschleimhaut und Gingiva findet die Zellneubildung grundsätzlich im Stratum basale statt. Darin stimmen meine Beobachtungen mit denen von BEAGRIE und SKOUGAARD (1963), LEBLOND, GREULICH und PEREIRA (1964), OEHLERT (1966), KIRSCHNER (1968) u.a. überein. 40 Min. nach ^3H -Thymidinapplikation findet man den Schwärzungseffekt im Autoradiogramm über der einzelligen Schicht des Stratum basale **. Werden 40 Min. nach ^3H -Thymidin-Gaben markierte Zellkerne im Stratum spinosum gefunden, so liegt das häufig an der Schnittführung, die nicht senkrecht zum Stratum basale gestanden hat; es ergeben sich Verprojektionen.

* Die Bestimmung erfolgt üblicherweise aus 1000 gezählten markierten und unmarkierten Zellen.

** "Stratum basale" und "Stratum germanitivum" wird hier gleichbedeutend gebraucht.

1. Tiergruppe I (Hartfutter)

Die lichtmikroskopische Betrachtung des Stratum basale von Gingivaepithel läßt schon bei der Durchsicht weniger Präparate verstärkte DNS-Syntheseaktivität in dem Bereich des DE erkennen, der dem EA angrenzt (Abb. 6). Eine ähnlich starke Häufung markierter Zellen bleibt über alle Tageszeiten erhalten und ist in der gesamten Oralmucosa nicht zu finden (KIRSCHNER 1968).

Eine deutlich niedrigere Markierungsrate als das Stratum basale von Gingivaepithel aufweist, zeigt das darunter liegende Bindegewebe auf. Hier sind nur vereinzelt markierte Zellen zu finden.

Unterschiede der Zellneubildungsraten werden unter annähernd gleichen Bedingungen zu verschiedenen Tages- und Nachtzeiten (8⁰⁰, 12⁰⁰, 16⁰⁰, 20⁰⁰, 24⁰⁰, u. 4⁰⁰) beobachtet. Die Zellneubildung verläuft rhythmisch.

Die Kurven in Abb. 7 stehen für die gemessene unterschiedliche Produktivität innerhalb eines Schleimhautareals über die Tages- und Nachtzeiten. Außerdem gibt das Diagramm 7 Auskunft über das unterschiedliche Zellneubildungsverhalten der Areale untereinander. Der Zellneubildungsrhythmus der 3 Gingivaabschnitte ist hier verschieden. KIRSCHNER (1968) konnte dagegen in allen Mundschleimhautarealen einer Tiergruppe einen annähernd gleichen Rhythmus feststellen. Von den Schleimhautarealen der Gingiva zeigt nur das OGE einen Rhythmus, der dem von KIRSCHNER beschriebenen ähnlich ist. DE und EA weichen davon deutlich ab. Dies muß mit der morphologischen und funktionellen Sonderstellung des den Zahn umgebenden Epithelsaumes zusammenhängen.

Gemeinsam sind den Gingivaarealen Maxima und Minima in der Zellneubildung. Alle Areale erreichen höchste Zellproduktivität um 20 Uhr, niedrigste um 8 Uhr. Nur das OGE weist einen wenig niedrigeren Wert um 12 Uhr auf.

a) Epitheliales Attachment (EA)

In diesem Gewebsabschnitt bereitet die Zuordnung markierter Zellen zu einem eindeutigen Stratum basale Schwierigkeiten. Eine exakt identifizierbare Basalschicht fehlt. Außerdem reichen Bindegewebspapillen oft tief in diesen Epithelabschnitt. Häufig werden sie in den Serienschnitten quer getroffen. Sie verlaufen also teilweise circulär zur Zahnoberfläche. Diese Besonderheiten erschweren die autoradiographische Auswertung erheblich (Abb. 8 u. 9).

Nach Durchsicht einer größeren Anzahl von Serienschnitten, lassen sich im basalen Abschnitt zwei Zellneubildungszentren unterscheiden. Die Bereiche sind als Region 1 und 2 bezeichnet (Abb. 3 u. 10). Region 2 stellt das untere Drittel des am Zahnschmelz anliegenden Epithelsaumes dar. Auf diese Region entfallen im Durchschnitt 8% aller markierten Zellen des EA 40 Min. nach ^3H -Thymidin-Applikation. Dieser Abschnitt konnte bei der statistisch-analytischen Bearbeitung der Zähl-ergebnisse nicht berücksichtigt werden, da die Zuordnung zu den für die Auswertung notwendigen unmarkierten Zellen schwierig war.

Die Zellneubildungsaktivität ist in diesem Gewebsabschnitt über die untersuchten Tages- Nachtzeiten (Abb. 7) nur geringen Schwankungen unterworfen. Nur um 20 Uhr erfolgt ein beträchtlicher Anstieg. Dieser Wert übersteigt geringfügig die Zellneubildung von DE und OGE.

b) Downgrowing Epithel (DE)

Bemerkenswert ist die überaus starke Proliferation eines begrenzten Basalabschnittes (Abb. 6). Über die Tages- Nachtzeiten findet man bei Tiergruppe I und II bis zu 70% der Zellneubildung im basalen Drittel, das unmittelbar an das EA angrenzt. Das zur Mundschleimhaut aufsteigende Stratum basale weist dagegen nur vereinzelt markierte Zellen auf. Im oberen Drittel befinden sich durchschnittlich nur noch 5% aller markierten Zellen. Auch JOGLEKAR et al. (1964) und BEAGRIE u. SKOUGAARD (1963) beschreiben eine starke Zellproliferation im unteren dem EA angrenzenden Bereich des DE. Dieser Basalabschnitt des DE stellt das aktivste Regenerationszentrum der gesamten Oralmucosa dar. Die beschriebene Zellneubildungskonzentration und ihre vermutliche Ursache wird später erwähnt. Die ^3H -Indices über die Tages- Nachtzeiten für das DE sind in Abb. 7 dargestellt. Die Kurven verlaufen wellenförmig. Die Produktivität nimmt von 8 Uhr stetig zu und erreicht um 20 Uhr ihren höchsten Wert und fällt dann bis gegen 8 Uhr langsam ab (24-Stunden-Beobachtung).

c) Outer Gingival Epithel (OGE)

Das OGE zeigt einen Proliferationsrhythmus, der dem von KIRSCHNER (1968) für die Oralmucosa beschriebenen ähnlich ist. In Tiergruppe I ist die Zellneubildung in den Nachtstunden 20⁰⁰, 24⁰⁰ und 4⁰⁰ Uhr charakteristisch hoch, der um 24⁰⁰ Uhr-Wert liegt etwas tiefer. Die Zellraten des Tages (8⁰⁰, 12⁰⁰ und 16⁰⁰ Uhr) sind gering. Die Mittelwerte für Oralmucosa und OGE sind in Abb. 11 zum Vergleich dargestellt. Der Mittelwert aller ^3H -Indices über die Tages- Nachtzeiten für das OGE liegt niedriger als der für EA, DE und Oralmucosa. In Abb. 17 sind die Mittelwerte der Zellneubildung für OGE und Oralmucosa zum Vergleich dargestellt.

Abb. 7: ^3H -Indices der Tiergruppe I über
die Tageszeiten (h) für EA, DE und OGE
40 Min. nach ^3H -Thymidinapplikation.

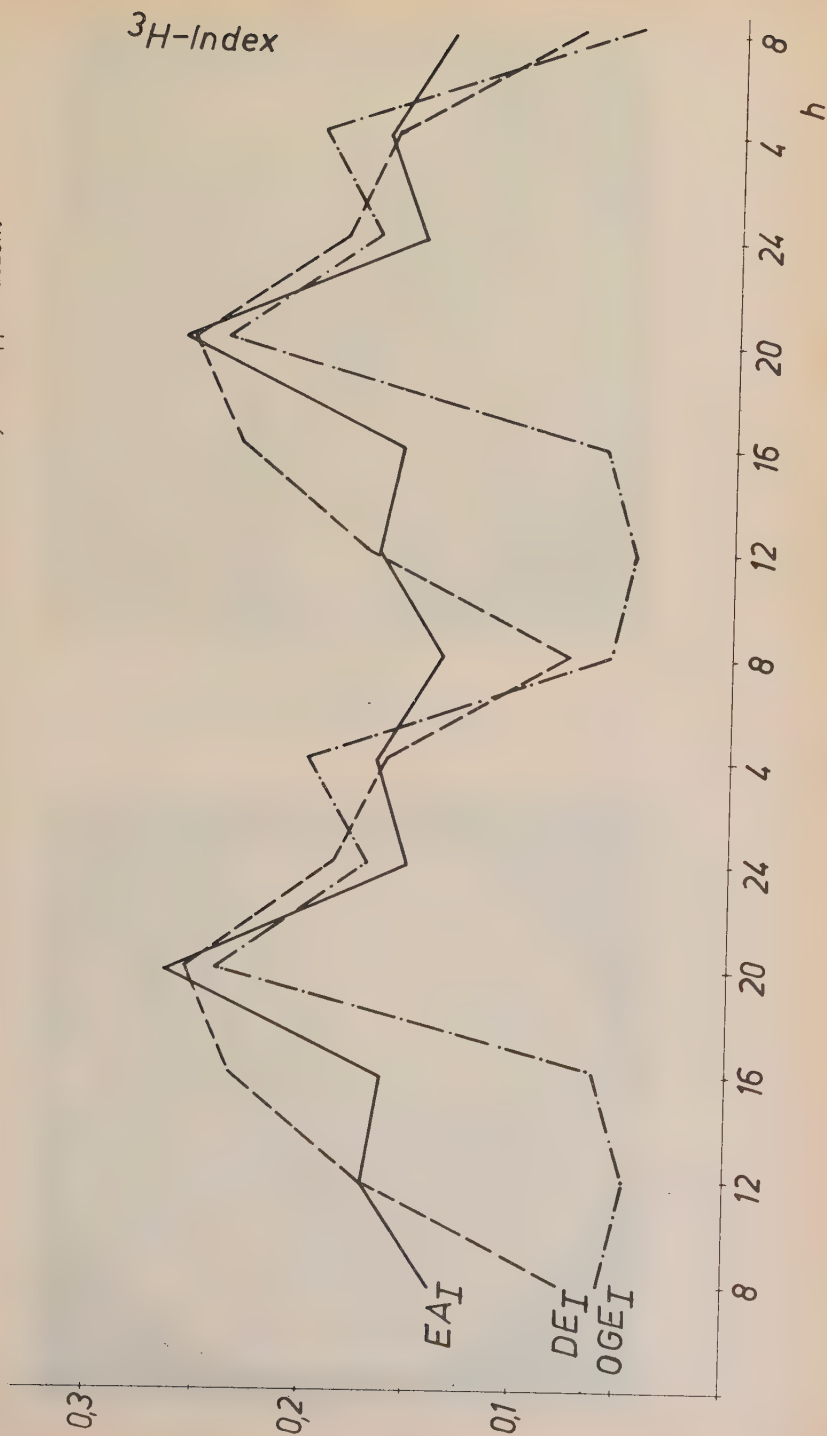




Abb. 8 u. 9: Bindegewebeinschlüsse im EA
(Maus 240:1 u. 480:1)



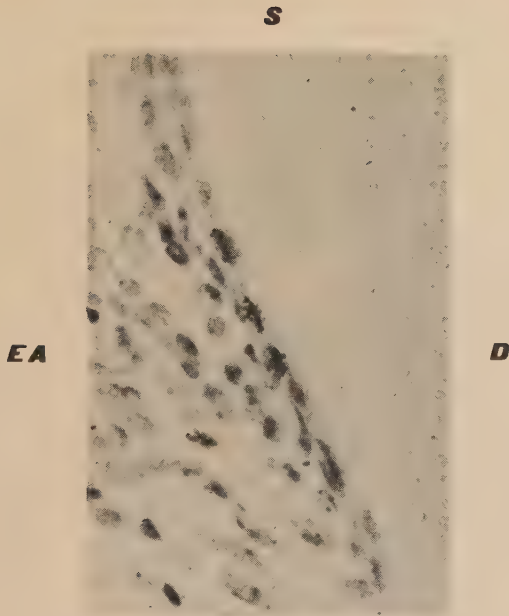


Abb. 10: DNS-synthetisierende Zellen in Region 2
des EA (vergl. Abb. 3) 40 Min. nach
 ^3H -Thymidinapplikation (1000:1).
S = Schmelz, D = Dentin, EA = Epitheliales
Attachment

Abb. 11: ^3H -Indices für Outer Gingival Epithel (OGE) und die Mittelwerte der Zellneubildung in Oral mucosa von Hartfüttern (MOI nach KIRSCHNER) über die Tageszeiten (h) 40 Min. nach ^3H -Thymidinapplikation.

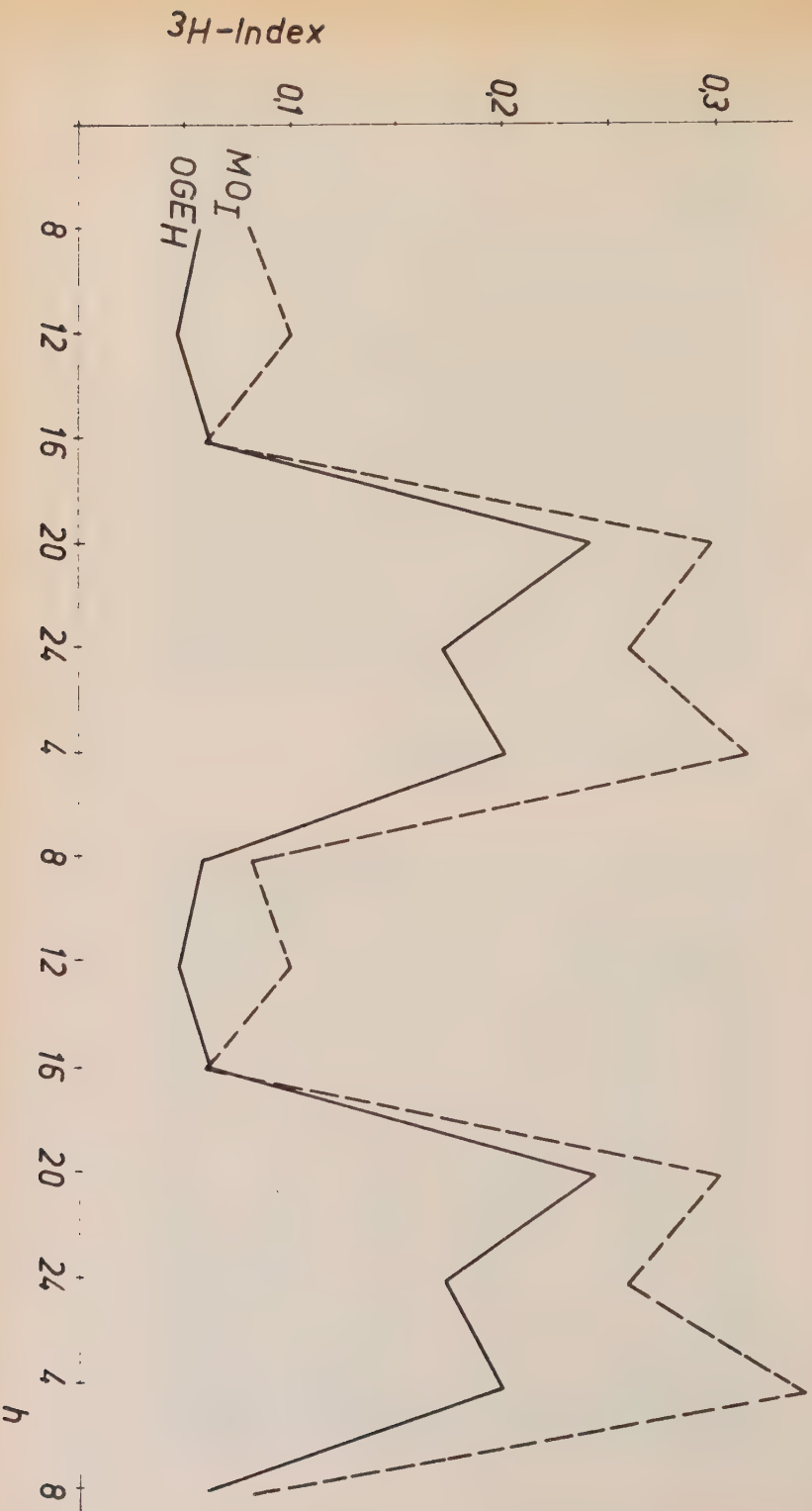
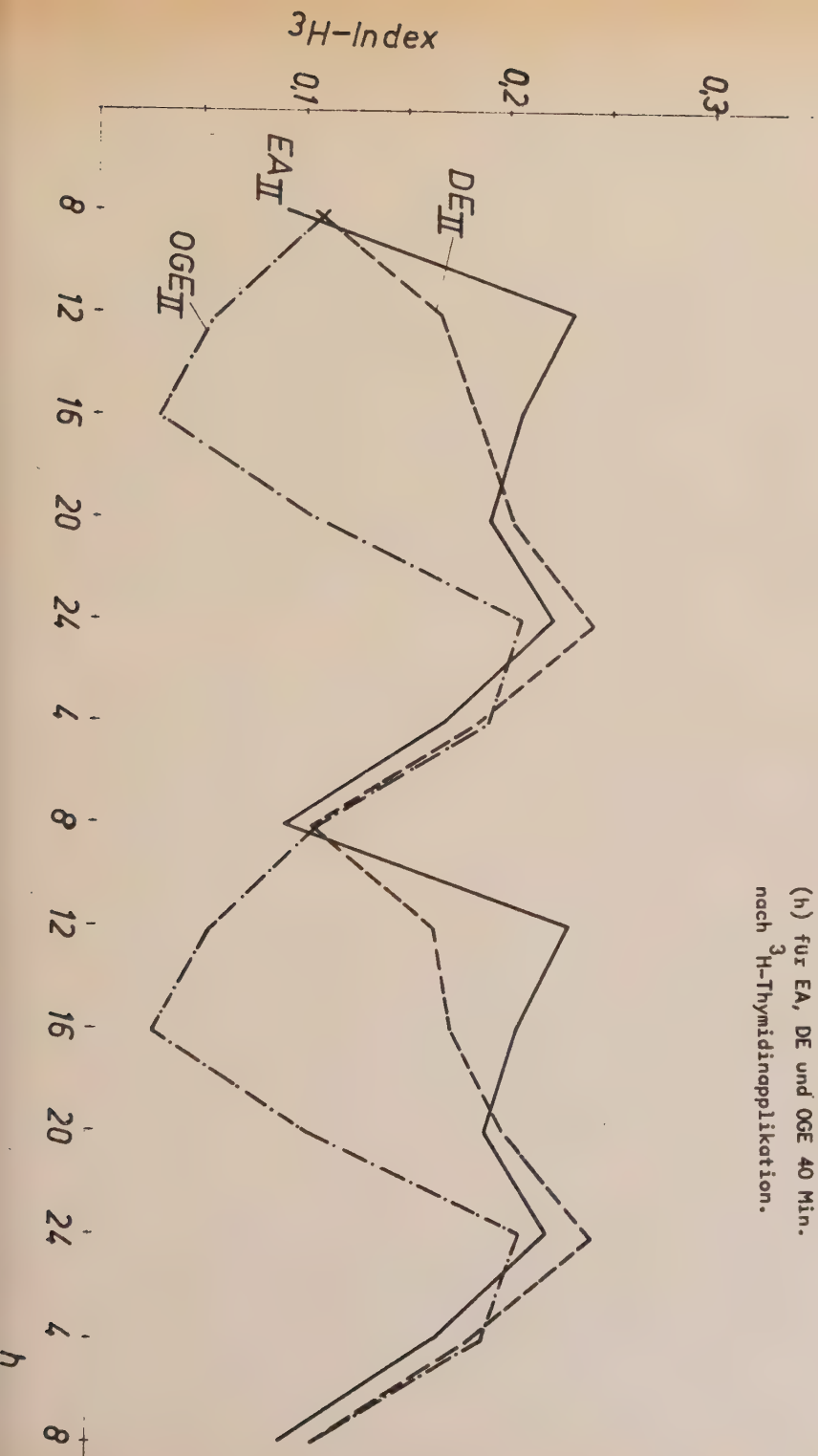


Abb. 12: ^3H -Indices der Tiergruppe II über die Tageszeiten (h) für EA, DE und OGE 40 Min. nach ^3H -Thymidinapplikation.



2. Tiergruppe II (Weichfutter)

Die mechanische Irritation der Gingiva durch die Nahrungskonsistenz und deren Einfluß auf die Zellneubildung war der Grund einer weiteren Versuchsreihe. Die Untersuchungen zeigen Ergebnisse über die Zellneubildung nach Gaben pulverisierter Kost. In den Abb. 13, 14 und 15 sind die ^3H -Indices der Gingivaabschnitte EA, DE, OGE von mit Weichfutter ernährten Tieren (Gruppe II) mit denen der Tiergruppe I (Hartfutter) verglichen.

Im OGE verhält sich die Zellneubildung ähnlich wie in den Abschnitten der Oralmucosa (KIRSCHNER 1968). Die mittlere Produktionsrate aller Tages- Nachtzeiten scheint jedoch geringer.

Im DE scheint die Zellneubildungsproduktivität in beiden Tiergruppen annähernd gleich zu sein, während eine stärkere Proliferation im EA II verglichen mit EA I vermutet werden könnte. Genaue Auskunft kann nur der statistische Vergleich erbringen.

a) Epitheliales Attachment (EA)

Eine verstärkte Zellneubildungsaktivität läßt dieser Gewebsbereich zwischen 12 und 24 Uhr mit den Maxima um 12 und 24 Uhr erkennen. Ein auffallend niedriger Wert liegt bei 8 Uhr. Der mittlere ^3H -Index der Tiergruppe II liegt etwas höher als der der Gruppe I. (Abb. 17) (Nähere Angaben unter "Statistischer Vergleich, S. 35).

b) Downgrowing Epithel (DE)

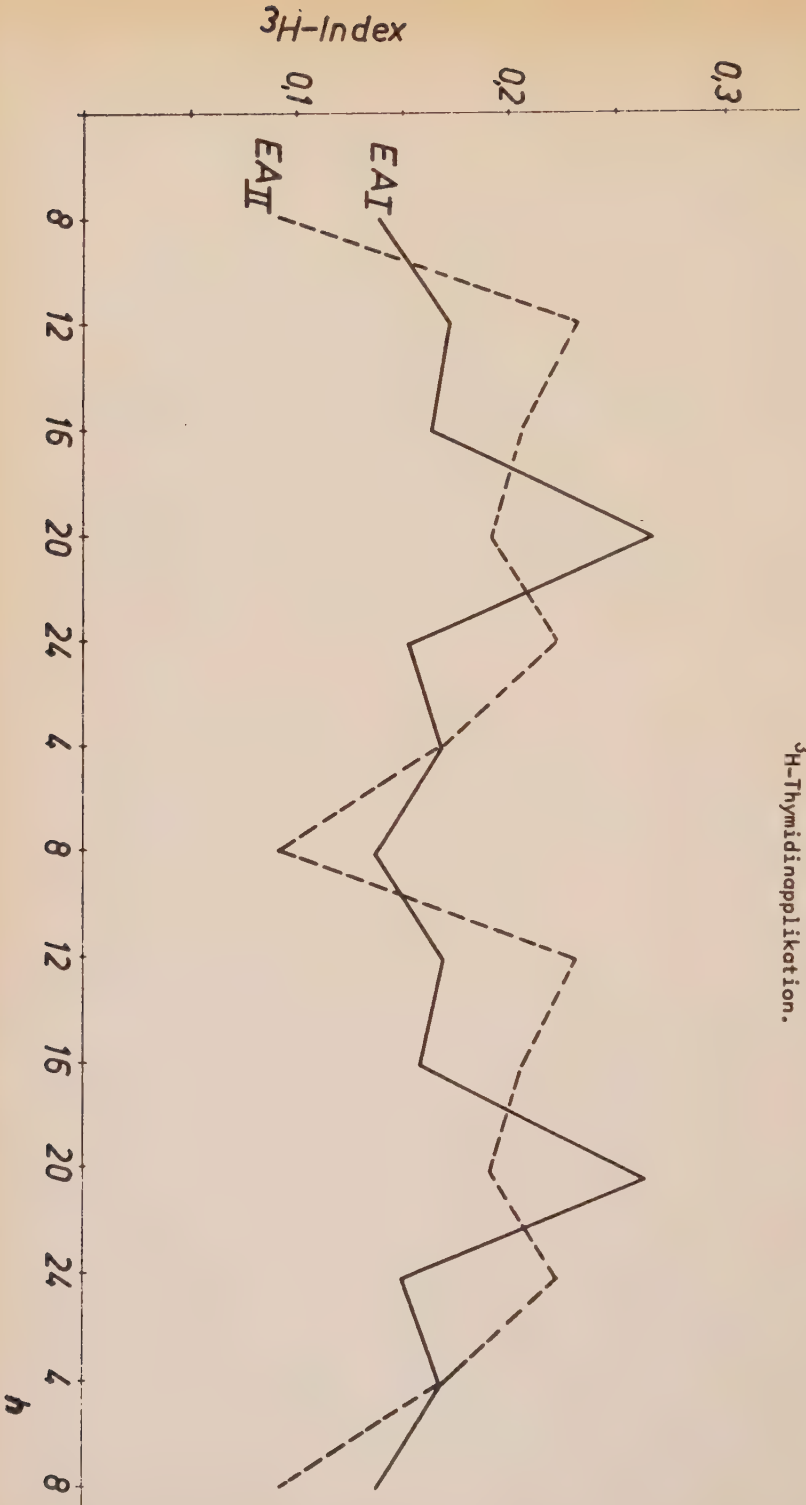
Der Produktionsrhythmus weicht von dem der Tiergruppe I ab. Er verläuft wellenförmig. Das Maximum liegt bei 24 Uhr das Minimum bei 8 Uhr (Abb. 14). Auch bei dieser Tiergruppe

stellt das dem EA benachbarte Stratum basale das aktivste Regenerationszentrum der gesamten Oralmucosa dar.

c) Outer Gingival Epithel (OGE)

Ebenso wie das OGE von Tiergruppe I einen der Oralmucosa von Hartfüttertieren ähnlichen Zellregenerationsrhythmus besitzt, scheint das OGE von Tiergruppe II der Oralmucosa von Weichfüttertieren ähnlich zu sein. (Abb. 16) Ebenfalls wie bei Tiergruppe I liegt hier zumindest der Mittelwert der ^3H -Indices aller Tageszeiten niedriger als der von EA, DE und Oralmucosa (Abb. 12 u. 17). Die Zahl DNS-synthetisierender Zellen nimmt von 16 bis 24 Uhr stetig zu und fällt annähernd gleichmäßig gegen 16 Uhr wieder ab.

Abb. 13: ^3H -Indices der Tiergruppen I (—) und II (---) über die Tageszeiten (h) für Epitheliales Attachment (EA) 40 Min. nach ^3H -Thymidinopplikation.



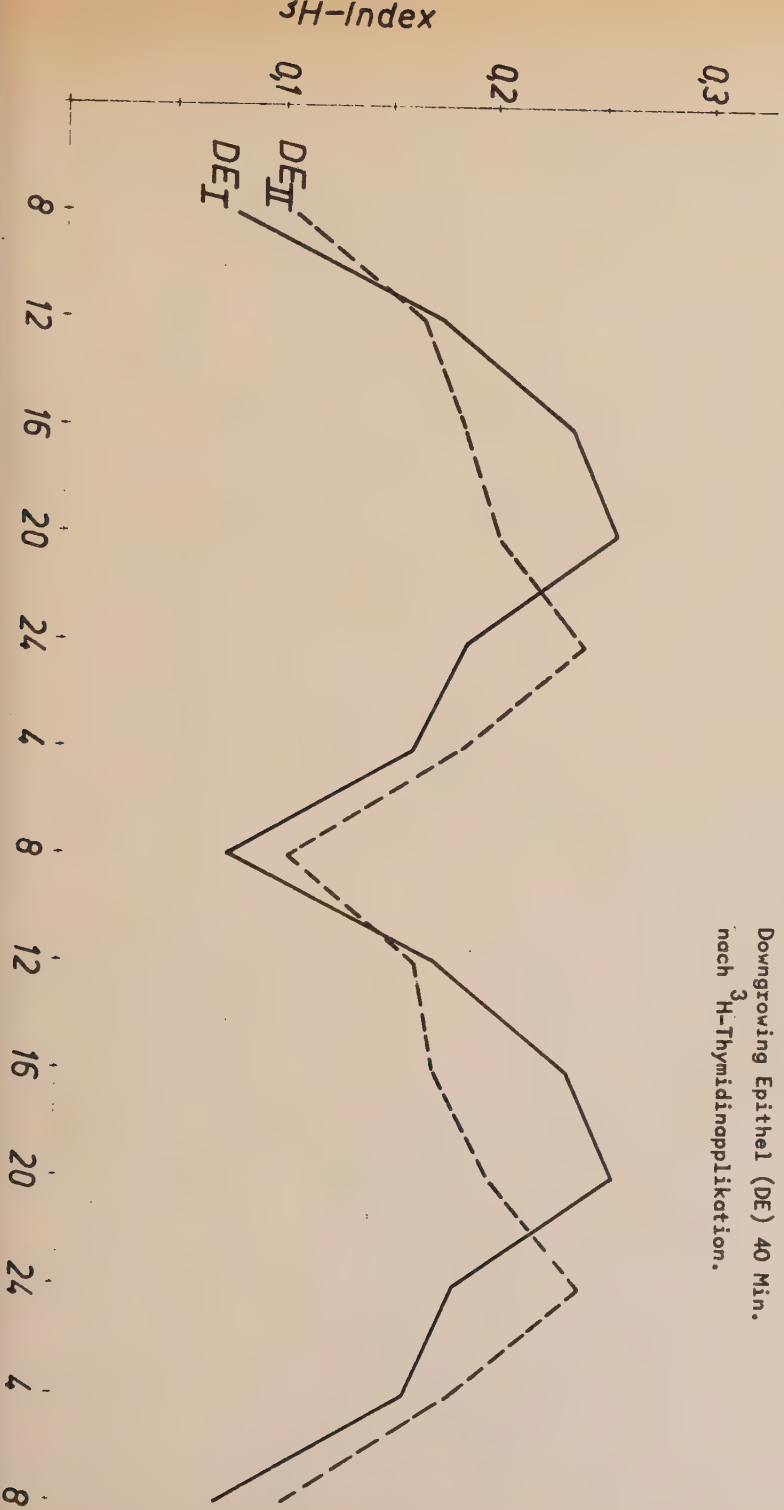


Abb. 14: ^3H -Indices der Tiergruppen I (—) und II (---) über die Tageszeiten (h) für Downgrowing Epithel (DE) 40 Min. nach ^3H -Thymidinapplikation.

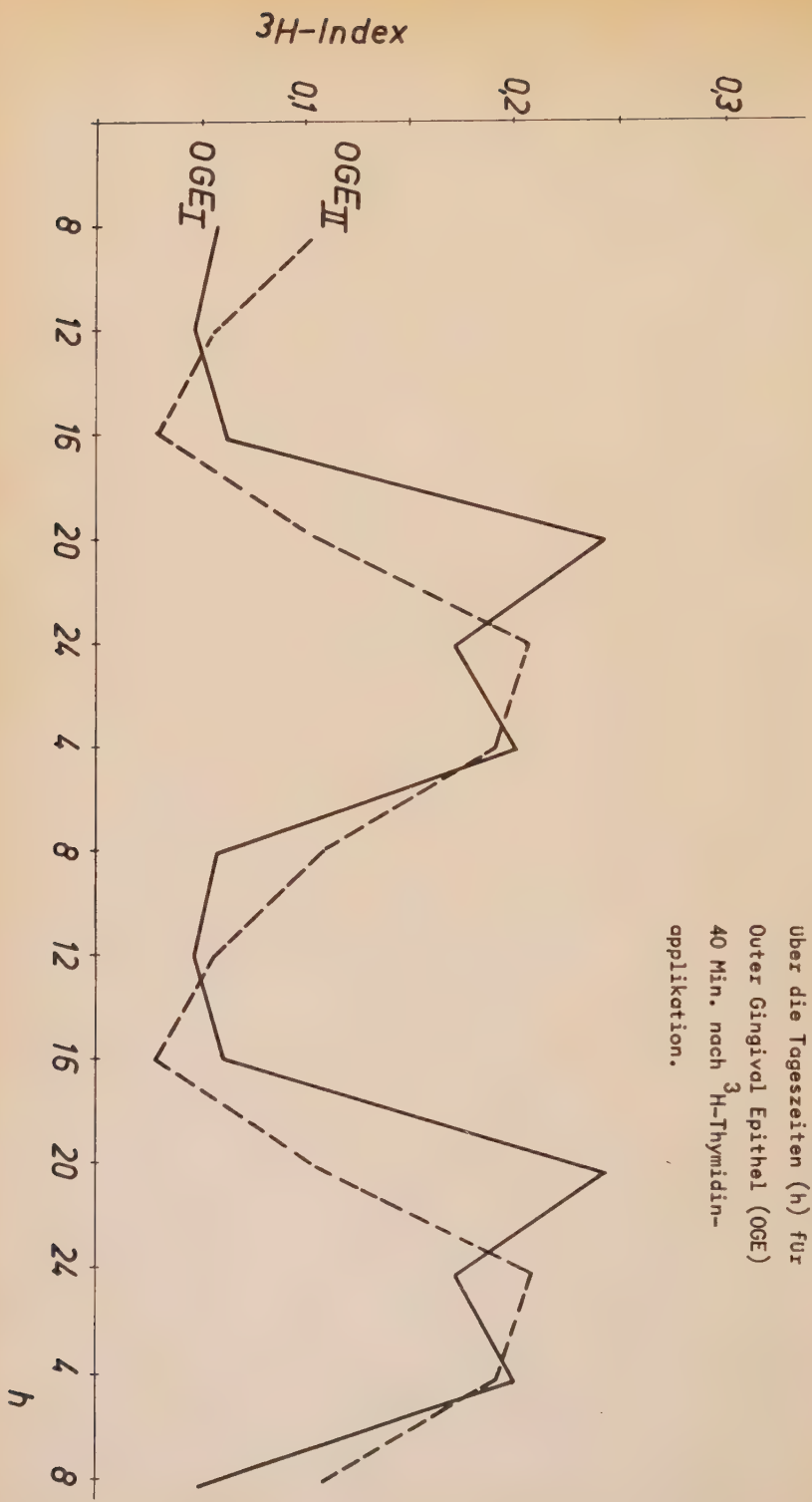
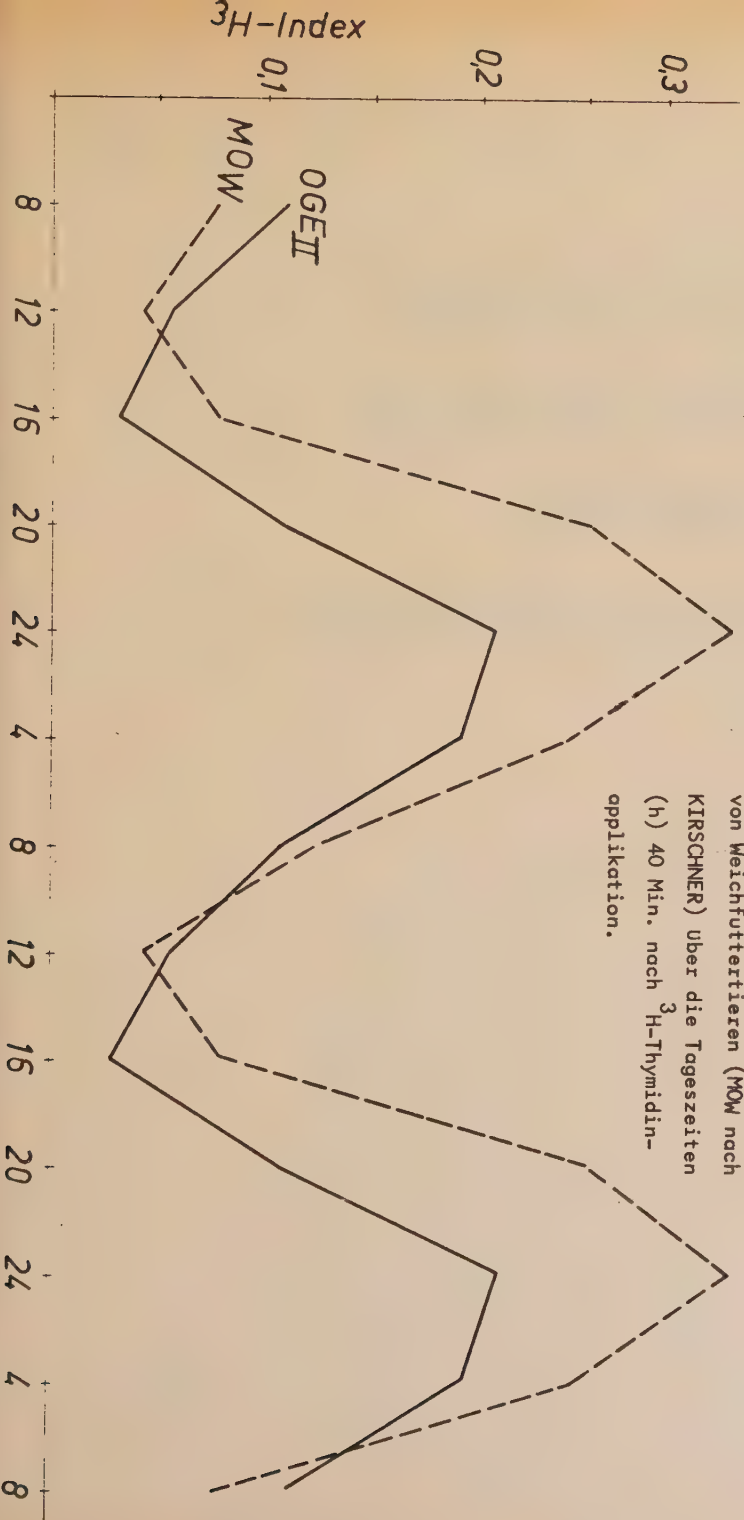


Abb. 15: ^3H -Indices der Tiergruppen I (—) und II (---) über die Tageszeiten (h) für Outer Gingival Epithel (OGE) 40 Min. nach ^3H -Thymidinapplikation.

Abb. 16: ^3H -Indices für Outer
Gingival Epithelium (OGE) und
die Mittelwerte für Oral mucosa
von Weichfuttertieren (MW nach
KIRSCHNER) über die Tageszeiten
(h) 40 Min. nach ^3H -Thymidin-
applikation.



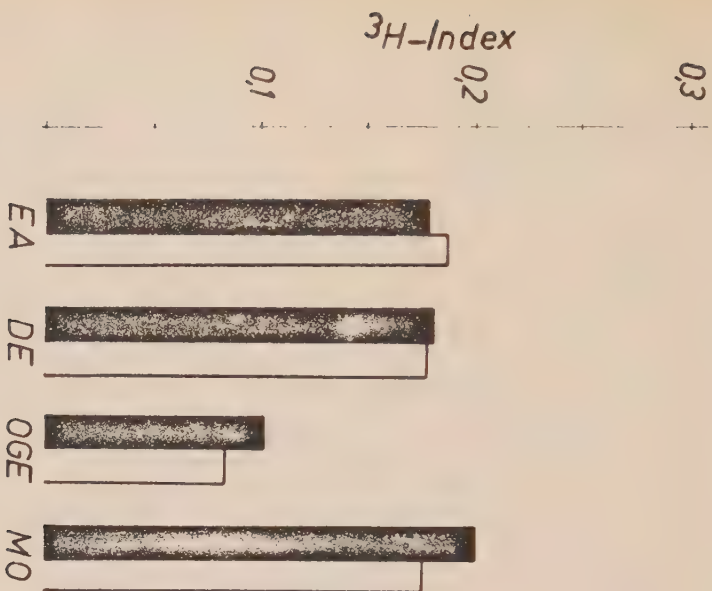


Abb. 17: Mittelwerte der ^3H -Indices aller Tageszeiten für die Schleimhautareale (Abszisse) EA, DE, OGE und Oral mucosa von Hartfuttern (schwarz) und Weichfuttern (weiß).

3. Varianzanalytische Untersuchungen

Die Zellneubildungsraten im EA bei Hartfutter (Tiergruppe I) und bei Weichfutter (Tiergruppe II) wurden varianzanalytisch verglichen. Der statistischen Untersuchung entspricht ein Modell nach WINER (1962), das den Vergleich durch einen "Drei-Faktoren-Plan mit wiederholten Messungen bei einem Faktor (C)" ermöglicht. Auf die Darstellung von Modell und Rechengang wird verzichtet. Die Tabelle 2 gibt Auskunft über das Ergebnis.

A	steht für "Nahrung" (weich-hart)	p = 2
B	steht für "Untersuchungszeiten"	q = 6
C	steht für "Gingiva-Areale"	r = 3
	(Replikationen)	n = 3)

Tab. 2

Quelle	SS	df	MS	F	p
Zwischen	2175,1936	35	62,148		
A	16,0472	1	16,047	1,26	
B	1396,0648	5	279,213	21,97	0,001
AB	458,1216	5	91,624	7,21	0,001
Fehler (zwischen)	304,9600	24	12,707		
Innerhalb	2805,1283	72	38,960		
C	697,1814	2	348,591	29,97	0,001
AC	25,3253	2	12,663	1,09	
BC	1231,7983	10	123,180	10,59	0,001
ABC	292,4161	10	29,416	2,53	0,05
Fehler (innerhalb)	558,4072	48	11,633		

Die Futtersorten (A) nehmen keinen gesicherten unterschiedlichen Einfluß auf die Zellneubildung in allen drei Arealen beider Versuchsreihen (insgesamt).

Der Zeitverlauf (B) (Rhythmus) ist jedoch hochsignifikant unterschiedlich (insgesamt).

Die Futtersorten haben signifikant Einfluß auf den zeitlichen Verlauf der Zellneubildung (AB).

In den drei untersuchten Arealen (EA, DE u. OGE in Versuch I u. II) besteht ein gesicherter Unterschied in der Zellneubildung (C) (insgesamt).

Allerdings wirkt sich die Ernährungsform (hart-weich) in den untersuchten Arealen nicht gesichert unterschiedlich auf die Zellneubildung aus (AC).

In den untersuchten Arealen ist der zeitliche Zellneubildungsverlauf signifikant unterschiedlich (BC).

Bei unterschiedlicher Fütterung ist der zeitliche Verlauf in der Zellneubildung der untersuchten Areale nicht gesichert unterschiedlich (ABC).

II Zellmigration

Die Verfolgung der markierten, postmitotischen, differenzierten Zellen ist in zweifacher Hinsicht wichtig:

Einmal um annähernd genau die Regenerationszeit verschiedener Epithelbereiche festzulegen. Zu diesem Zweck konzentriert sich die Beobachtung hauptsächlich auf die Ankunft voll markierter Zellen am Stratum corneum bzw. der Papillenspitze des untersuchten Bezirkes. Zum anderen gibt die Beobachtung der "migrierenden" Zelle auf dem Wege vom Stratum basale bis an das Stratum corneum teilweise Aufschluß über den Erneuerungs-vorgang.

Über den Ablauf war bis zu den veröffentlichten Untersuchungen im Jahre 1968 über Oralmucosa von KIRSCHNER wenig bekannt.

Die von Mundschleimhaut abweichende Struktur der Gingiva erschwert die Untersuchungen, ganz besonders durch den uneinheitlichen Verlauf des Stratum basale im EA.

1. Epitheliales Attachment (EA)

Etwa 10 Stunden nach Thymidin-Applikation hat sich die markierte Zellgeneration geteilt. Im basalen Bereich ist es zu einer starken Vermehrung markierter Zellen gekommen, die nunmehr eine deutliche Reduktion der Markierung (Silbergranulae) über den Zellkernen aufweisen. Dieser initiale Vorgang kommt in der graphischen Darstellung Abb. 21 besonders gut zum Ausdruck.

Die Präparate des "20 und 25-Stundenversuches" weisen eine zahlenmäßig noch größere Ansammlung markierter Zellen im Basalabschnitt auf. Die weitere Reduktion der Markierung war schwer zu objektivieren und kommt daher in der Graphik weniger deutlich zum Ausdruck. Das liegt an den bereits erwähnten technischen Schwierigkeiten bei der Festlegung der Zellneubildungszone im EA. Post-

mitotische, differenzierte Zellen der vorhergehenden Zellgeneration vermischen sich mit dem Zellschub, der gerade die Teilung abgeschlossen hat.

Die Untersuchungen sprechen eindeutig dafür, daß die beobachtete markierte Zellgeneration innerhalb von 24 Stunden zwei Teilungen durchmacht.

Zwischen 25 und 30 Stunden verlassen markierte Zellen der ersten Generationswelle das untere Drittel des EA. Nach 40 Stunden haben markierte Zellen gut die Hälfte des Weges zurückgelegt -wenn man als Ziel den äußersten coronalen Zipfel des EA ansieht- und nach 50 Stunden erreichen die "Vorläufer" der markierten Zellwelle den spitzwinklig auslaufenden (coronalen) Gewebsbereich des EA. Nach 60-65 stündiger Versuchszeit sieht man nur noch vereinzelt Zellen der ersten Generationswelle in der "hohen Region". Von basal rücken mit verminderter Silberkornzahl markierte Zellen nach. Die Regeneration des EA wird auf etwa 65 Stunden geschätzt.

Berücksichtigt man die keilförmige, sich stark verjüngende Form des EA so erhebt sich die Frage, ob die an der Basis entstandenen differenzierten Zellen sämtlich in diesen äußersten Winkel "migrieren". Abb. 20 zeigt den von der Zelle zurückgelegten Weg in Abhängigkeit von der Versuchszeit. Es kann vermutet werden, daß die Zelle ab 30 Stunden eine wesentlich größere Entfernung pro Zeiteinheit zurücklegt, als im vorangehenden Zeitraum. Die Geschwindigkeit der Zelle -bei gleichbleibendem Zellnachschieben von der Basis- müßte sich im engeren Gewebsbereich beträchtlich erhöhen. Die Abschilferungsrate des EA muß demnach -bezogen auf die sehr kleine Oberfläche- auch äußerst hoch sein.

Die in den Kapiteln B und C besprochenen Zellneubildungszentren R1 und R2 (s. Abb. 3) im basalen Abschnitt des Epithelansatzes (EA) bedingen zwei Migrationsrichtungen. Die Hauptrichtung der Zellen aus Region 1 habe ich soeben besprochen. Die Beobachtungen sprechen dafür, daß die in diesem Zeitraum gebildeten Zellen nur in geringem Maße in die DE und EA trennende Keratinschicht übergehen. Die in Region 2 gebildeten Zellen schieben sich dicht am Schmelz aufwärts zur Papillenspitze des EA. Bei den Untersuchungen fand sich kein Anhalt für eine Angabe markierter Zellen aus dieser Schicht in den übrigen Gewebsbereich des EA.

2. Downgrowing Epithel (DE)

Auffallend war eine bemerkenswert starke Zellproliferation in dem basalen, dem Attachment angrenzenden Teil des DE, wie beschrieben. In dem unteren Drittel des Stratum basale des DE befinden sich 69,5% der markierten Zellen. Dieses Verhältnis ändert sich für migrierende Zellen nur geringfügig nach 40 Stunden. Erst nach 60 Stunden sind die Zellen über den ganzen Gewebsabschnitt des DE gleichmäßig verteilt. Die Untersuchungen sprechen dafür, daß das DE vorwiegend aus dem unteren basalen Abschnitt erneuert wird. Die Zellen migrieren in fast vertikaler Richtung zur Papillenspitze, wobei sie sich aber langsam der DE und EA trennenden Keratinschicht nähern und aufsteigend nach und nach in die Verhornung gehen.

Aus dem großen Serienschnittmaterial wurden schematische Zeichnungen rekonstruiert. Die einzelnen "Zellgenerationswellen" sind durch schwarzes Ausfüllen der Zellkerne (Reduktion der markierten Substanz nach jeder Teilung) sichtbar gemacht (Abb.19) (1-70 Stunden).

Nach 70-80 Stunden tritt eine Verminderung der Migrationszellen im hohen Bereich des EA (Abb. 20) ein. Die erste Zellwelle ist in die Verhornung gegangen bzw. abgeschilfert; es folgen neue Zellen mit reduzierter Silberkornzahl nach.

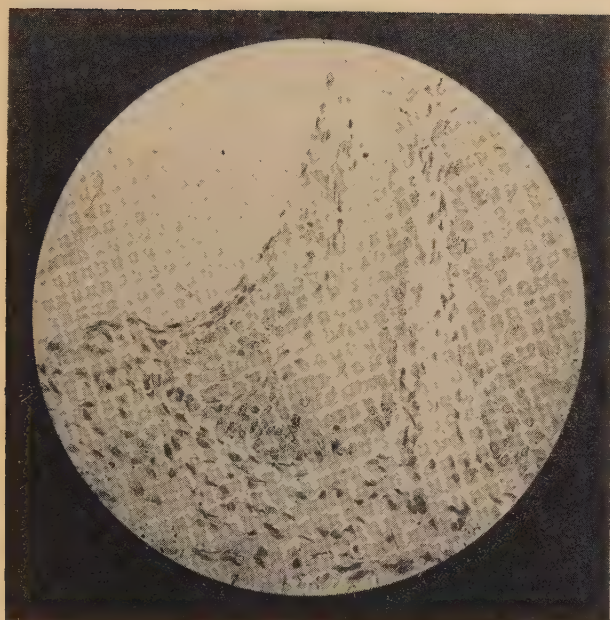


Abb. 18: Gingiva (Maus) 40 Stunden nach ³H-Thymidinapplikation (480:1).

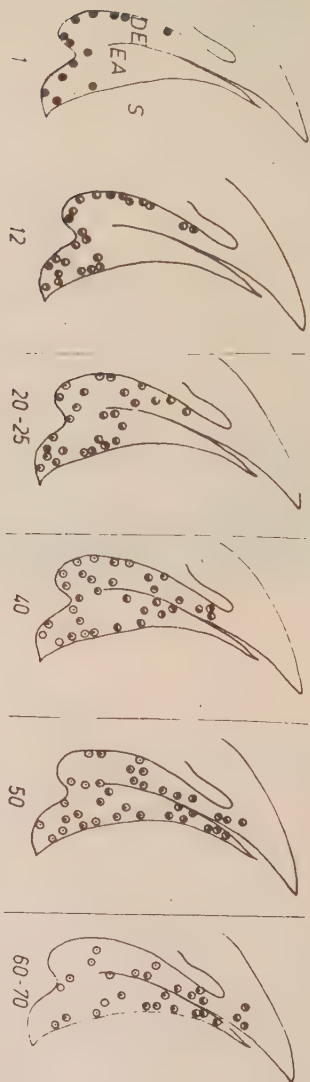
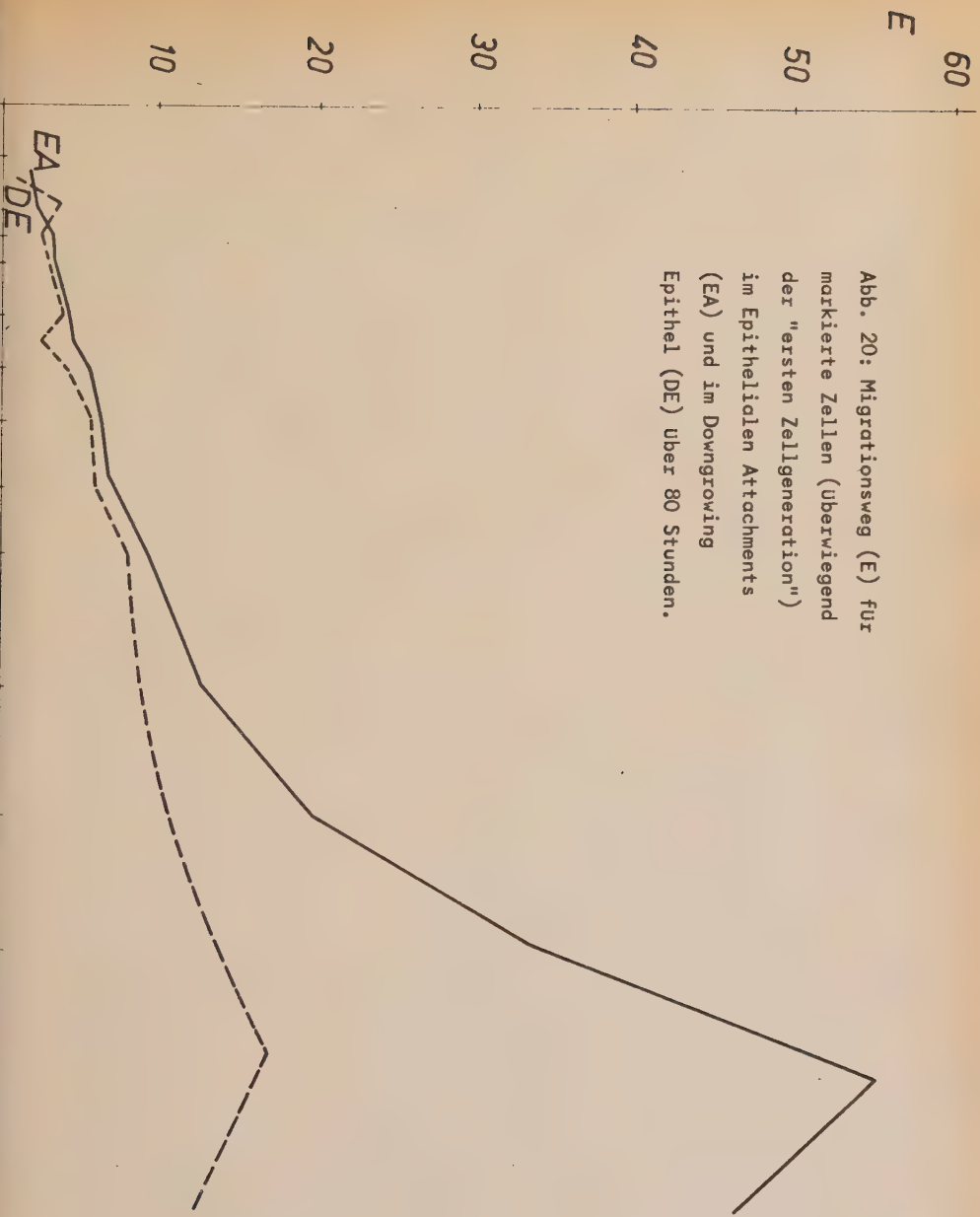


Abb. 19 : Schema der Zellmigration im EA und DE der Maus 1, 12, 20, 25, 50 und 60-70 Stunden nach einmaliger Dosis ^3H -Thymidin. Reduktion der markierten Substanz um 50% nach jeder Zellteilung. Zellkerne der ersten Zellgeneration = $1/2$ ausgefüllt, der zweiten Zellgeneration = $1/4$ ausgefüllt und der dritten Zellgeneration = punktiert.

Abb. 20: Migrationsweg (E) für
markierte Zellen (überwiegend
der "ersten Zellgeneration")
im Epithelialen Attachments
(EA) und im Downgrowing
(DE) über 80 Stunden.



EA
DE

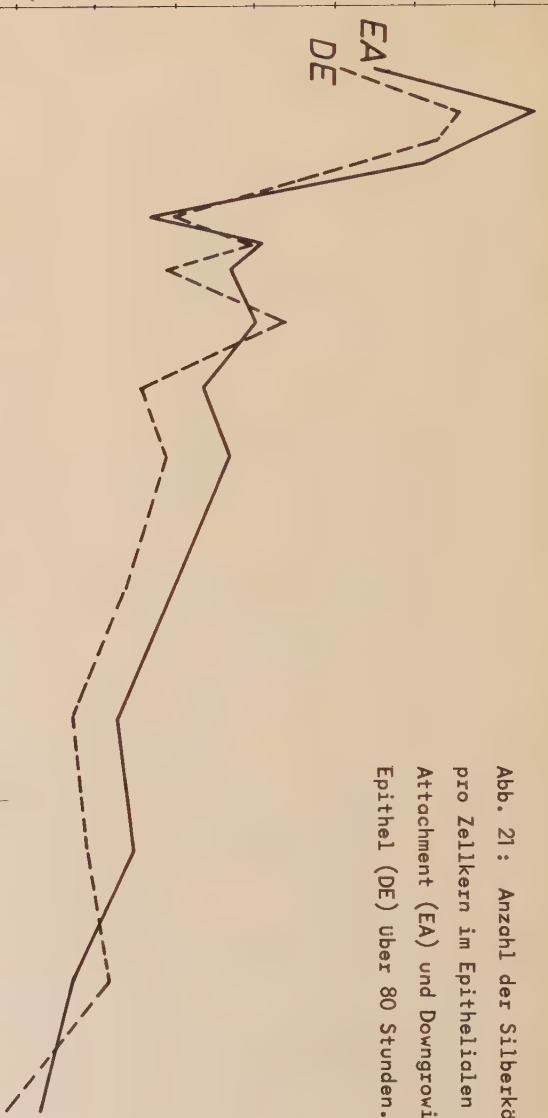


Abb. 21: Anzahl der Silberkörner pro Zellkern im Epithelialen Attachment (EA) und Downgrowing Epithel (DE) über 80 Stunden.

1 4 6 8 12 16 20 25 30 40 50 60 70 80 Stden

E Besprechung der Ergebnisse

HIRT, HARTL, MÜHLEMANN (1955), HARTL (1956), GREULICH (1961), BEAGRIE (1963, 1966), TROTT und GORENSTEIN (1963), SKOUGAARD und BEAGRIE (1962), YOUNG (1968) u.a. haben die Zellneubildung in der Gingiva verschiedener Tierarten untersucht (Maus, Ratte, Affe). Da die Experimente mit Hilfe unterschiedlicher methodischer Verfahren ausgeführt wurden (Autoradiographie, Colchizinverfahren), beruhen die Angaben über die Zellerneuerung auf der Beobachtung bestimmter Phasen (S-Phase oder M-Phase) des Zellgenerationszyklus. Allerdings ist in allen mir bekannt gewordenen Untersuchungen über Gingivagewebe die in dieser Arbeit ausdrücklich beobachtete 24-Stundenbetrachtung vernachlässigt worden.

Die Gewebsregeneration ist von der Zellneubildungsaktivität eines Gewebes abhängig. Die Zellneubildung wiederum ist innerhalb einer 24-stündigen Untersuchungsphase unterschiedlich. In der vorliegenden Arbeit ist entsprechend der Versuchsanordnung früherer Arbeiten (KIRSCHNER, 1967, 1968, KIRSCHNER u. RÜHL 1969) ein vierstündiges Untersuchungsintervall gewählt worden, um die Zellneubildungsvorgänge im EA und DE lückenlos zu erfassen. Nach Berechnung erbringt ein 2-Stunden-Intervall nur wenig genauere Werte, wie Voruntersuchungen zeigten.

Strittig erscheint die Lokalisation der Zellneubildungszone im EA. JOGLEKAR, TOTO u. GARGIULO (1964) berichten über das Vorkommen DNS-synthetisierender Zellen sowohl im Stratum basale als auch im Stratum spinosum der Interdentaltapille. Die eindeutige Zuordnung der in Teilungsvorbereitung befindlichen Zellen zu einer einzelligen Basalschicht im EA bereitet im Einzelpräparat Schwierigkeiten. Überschaubar

man ein großes Serienschnittmaterial gibt es kaum Zweifel, daß auch im EA die unterste mit der Basalmembran in Kontakt stehende Zellschicht das eigentliche Keimzentrum darstellt.

Zwar wurden vereinzelt markierte Zellen auch in höheren Zelllagen gefunden; Basalzellen können aber - bedingt durch die jeweilige Schnitttrichtung zur Basalmembran - in das Stratum spinosum projiziert werden. Hinzu kommt die starke bindegewebige Verzapfung des EA. Die Bindegewebspapillen verlaufen circular und vertikal zur Zahnachse (Abb. 8 u. 9). Das EA ist stark vaskularisiert. Die starke Verzapfung des subepithelialen Bindegewebes in dem epithelialen Bereich des Attachments, die stärkere Vaskularisierung deuten auf die Sonderfunktion des EA im Vergleich zur übrigen Mundschleimhaut hin.

BEAGRIE und SKOUGAARD (1963), beobachteten markierte Zellen 40 Min. nach ^3H -Thymidin-Applikation in höheren Epithellagen, ordeneten diese Zellen aber aufgrund der topographischen Verhältnisse als Basalzellen ein.

LEBLOND, GREULICH u. PEREIRA (1964) gaben Prozentwerte zu markierten Zellen an, die 40 Min. nach ^3H -Thymidin-applikation in den einzelnen Epithelschichten gefunden wurden. Bei der Ratte fanden sich 99% der markierten Zellen im Stratum basale, bei der Maus 97%.

BEAGRIE und SKOUGAARD (1962), TROTT und GORENSTEIN (1963), GREULICH (1961) und YOUNG (1968) fanden im EA eine weit höhere mittlere Proliferationsrate als im übrigen Oralepithel.

Die Zellneubildung im EA eigener Versuchsreihen liegt im Mittel (über 24 Stunden) annähernd so hoch wie die Proliferation im DE und in Oral mucosa. Dieses Ergebnis war grund-

sätzlich in beiden Hauptversuchen zu erzielen trotz Verabreichung von Futter unterschiedlicher Konsistenz.

Die Unterschiede zwischen den in der Literatur angegebenen und eigenen Versuchsergebnissen werden auf die Vernachlässigung der 24-Stunden Periodik bei anderen Untersuchungen zurückgeführt.

Für die Bestimmung der Zellneubildungsrate im Stratum basale ist eine Abgrenzung der verschiedenen Gewebsbereiche wichtig (KIRSCHNER, 1967 a, 1967 b, 1967 c, 1968). Die Abschnitte EA und DE der Gingiva sind durch eine fast vertikal verlaufende Keratinisierung getrennt. Diese Aufteilung benutzen u.a. SKOUGAARD und BEAGRIE (1961), BEAGRIE (1963, 1966). TROTT und GORENSTEIN (1963) wählten bei Untersuchungen an der Ratte eine horizontale Einteilung (Abb. 22). Dadurch werden Teilabschnitte des Stratum basale vom DE für die Bestimmung der Zellneubildungsrate des EA miterfaßt. Da die Zellproliferation gerade im untersten Abschnitt des DE sehr hoch ist, muß die von TROTT und GORENSTEIN gewählte Methode eine falsche Vorstellung über das wahre Proliferationsgeschehen in den einzelnen Gewebsbereichen vermitteln. Sie erklären diese starke Zellproduktion u.a. mit der verhornungsfreien Geweboberfläche, die dadurch einem größeren Zellverlust unterliegen soll.

Die Annahme, daß unter physiologischen Bedingungen in nicht keratinisierten Schleimhautabschnitten eine höhere Zellneubildung im Stratum basale erwartet werden muß, kann nicht bestätigt werden (ORBAN 1962, u.a.), (KIRSCHNER, 1967, 1968, KIRSCHNER und RÜHL 1969).

Die von mir gefundenen Werte für die Zellneubildung im EA lassen dennoch eine sehr hohe Abschilferungsrate vermuten, wenn man die im Längsschnitt fadenförmig auslaufende

Papillenspitze zu dem großdimensionierten Basalbezirk als Regenerationszentrum in Beziehung setzt. Die Abschilferungsrate wird um so größer, wenn man annimmt, daß die Zellen des EA nicht -oder nur zum geringen Teil- in der DE und EA trennende Keratinschicht verhornen.

Mit dem "Sprung in die Verhornung" löst sich der Zellkern auf. An der Spitze des EA der Maus ist eine Keratinisierung unwahrscheinlich, da häufig beobachtet wurde, daß die Markierung bis zum Verlust der Zelle erhalten blieb.

Auch beim Menschen verhornt das Epithel des Gingivalsulcus nicht. Bei der Absonderung werden die Zellen vermutlich vom Transudat getragen (BEAGRIE, 1963). Die Umgebung einer Zelle, die sich von der Oberfläche gelöst hat, verändert sich bis zu ihrem Verlust wenig, da das Transudat (BRILL u. KRASSE, 1958) dieselbe Zusammensetzung wie Blutplasma besitzt (BRILL u. BRÖNNESTAM 1960). Folglich können diese Zellen ihre Vitalität erhalten, bis sie den Speichel der Mundhöhle erreichen. Als solche stellen sie beim Menschen vermutlich einen "defence plug" zwischen Schmelz und verhorntem Epithel dar. WAERHAUG (1952) und HARVEY (1962) haben gezeigt wie Fremdkörpermaterial in Form von Tinte und Amalgamlegierung aus dem Gingivalsaum heraustransportiert wird. BEAGRIE (1963) folgert, daß losgelöste oberflächlich liegende Zellen bei der Maus auf gleiche Art entfernt werden.

Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse zeigen, daß die DNS-Synthese in den Zellen des EA und DE über die Tageszeiten rhythmisch erfolgt. Die tageszeitlichen Schwankungen sind deutlich, wenn auch geringer als die in der Mundschleimhaut gefundenen (KIRSCHNER, 1968).

BULLOUGH (1949, 1952) konnte ein Rhythmik in der Zellneubil-

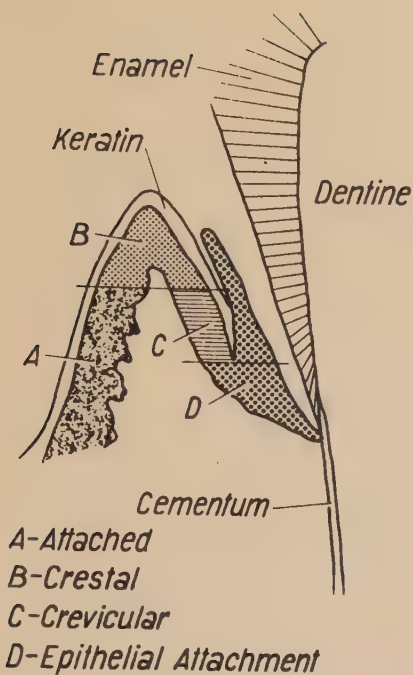


Abb. 22: . Einteilung der Molarengingiva (Ratte)
in Einzelabschnitte zur Bestimmung
der Mitoserate (nach TROTT und
GORENSTEIN, 1963).

dungsrate der Ohrepidermis nachweisen, die unter mechanischer Reizung und biologischer Aktivität variiert. Maxima und Minima entsprachen z.B. niedriger bzw. höherer lokomotorischer Aktivität der Tiere. KIRSCHNER (1968) hat diese Vorgänge in seinen Untersuchungen über die Zellneubildung in Oralmucosa ebenfalls bewiesen.

Verglichen mit der tages- nachtzeitlichen Zellneubildung in der Oralmucosa (KIRSCHNER 1967, 1968), liegt der rhythmische Zellneubildungsverlauf in Gingivaabschnitten anders. Auch hier ist der Zeitverlauf (Rhythmus) hoch signifikant (Tab. 2 $B/F = 21,97$ $p > 0,001$) jedoch "in sich" ausgeglichener. (vergl. z.B. Abb. 13 mit Abb. 15).

Eine exakt beweisende Erklärung kann hierfür im Augenblick noch nicht gegeben werden.

Die Zellproliferation ist im EA u. DE während der Nacht grundsätzlich gering höher als am Tage. Diese Ergebnisse hängen mit dem Verhalten der Tiere eng zusammen. Tierart, Jahreszeit, Licht- und Temperaturverhältnisse, körperliche Aktivität, Futteraufnahme u.a. und Gewebsregeneration bedeuten eine Kette unmittelbar voneinander abhängiger Faktoren, wobei die natürliche (z.B. Jahreszeit) oder artifizielle Änderung des Einzelfaktors einen experimentell beweisbaren Einfluß auf die Gewebsregeneration hat. KIRSCHNER (1967) konnte beweisen, daß z.B. die Jahreszeit (damit gekoppelt der Lichteinfluß etc.) den rhythmischen Zellneubildungsverlauf in Oralmucosa verändert. Ebenso hat KIRSCHNER (1967, 1968) in weiteren Versuchen durch Änderung der Nahrungskonsistenz signifikante Differenzen in der Zellneubildung von Oralmucosa erzielt.

In meinen Gingivauntersuchungen konnte ich letzteres Ergebnis (Hart-Weichfutter) in Bezug auf die von KIRSCHNER in Mund-

schleimhaut gefundene differente Zellneubildung nicht reproduzieren (Tab. 2, $A/F = 1,26$ $p < 0,01$) obwohl sich in statistisch verglichenem Zellneubildungsverlauf (Rhythmus) meiner unterschiedlich gefütterten (hart-weich) Tiere ein signifikanter Unterschied in Gingivaabschnitten ergab (Tab. 2, $AB/F = 7,21$ $p < 0,001$). Die genauen Zusammenhänge können erst durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

Unabhängig von dem Problem "Nahrungskonsistenz - Zellneubildung" sollen zum besseren Verständnis der Arbeit einige Ergebnisse der Literatur und der eigenen "Migrationsversuche" an der Gingiva besprochen werden.

Der Zellverlust an der Oberfläche schneller Wechselgewebe entspricht der Zellneubildungsaktivität im Stratum basale (LAU 1962, BERTALANFFY 1963 a, 1963 b), wenn der fortlaufende Zellnachschub durch bivalente Zellteilung erfolgt (ROLSHOVEN 1951).

Die Totipotenz der Mutterzelle führt zur Bildung von zwei Tochterzellen, von denen eine als Verlustzelle durch den fortlaufenden Zellnachschub "migriert" und sich nicht mehr teilt. Die zweite Tochterzelle verharret im Stratum germinativum, behält ihre Totipotenz und gewährleistet weitere Zellvermehrung.

Wie bekannt, wird radioaktiv markiertes Thymidin während der S-Phase des Zellgenerationszyklus in die chromosomale DNS eingebaut. Da die DNS der differenzierten Zelle keinem Stoffumsatz unterliegt (HUGHES 1959), bleibt die Markierung bis zum Untergang der Zelle erhalten. Die in der Basalschicht verbleibende intermitotische Zelle gibt ihre Markierung bei erneuter Teilung zu gleichen Anteilen den entstehenden Tochterzellen (TAYLOR 1958, 1960). Daher ist es gut vorstellbar, daß die Anzahl der Silberkörner über den Zellkern in Abhängigkeit von der Zellgenerationsdauer kontinuierlich abnimmt (Abb. 21).

QUASTLER (1960), QUASTLER u. SHERMAN (1959) gaben für das Intestinalepithel von Mäusen folgende Zeiten für die einzelnen Phasen des Generationszyklus an:

G1 = (9,5 Stden.) - S=(7,5 Stden.) - G2 + Mitose=(1-2 Stden.).

Andere Autoren haben gleiche und ähnliche Zeiten gefunden.

Eigene Untersuchungen sind Bestätigung dieser Befunde.

BEAGRIE (1963) berechnete aus radioaktivem Index und DNS-Synthesezeit die Gewebserneuerung nach folgender Formel:

$$t = \frac{100}{r} \times \frac{S}{24}$$

t = Erneuerungszeit in Tagen

S = DNS-Synthesezeit in Stunden

r = radioaktiver Index in %

Diese Methode berücksichtigt morphologische Besonderheiten der Gingiva und den 24 Stundenrhythmus nicht; sie ist daher für diese Untersuchung unbrauchbar.

Über das Verhalten der Verlustzelle zwischen Stratum basale und Stratum corneum war bisher wenig bekannt. LEBLOND, GREULICH und PEREIRA (1964) haben die "Abwanderung" der markierten Zellen in Oesophagusschleimhaut der Ratte beobachtet und für die Verweildauer der Zellen in den einzelnen Schichten der Schleimhaut Zeitangaben gemacht. Untersuchungen von KIRSCHNER (1968) lassen auf ein exaktes Migrationsschema schließen, in dem Migrationsgeschwindigkeit der Zelle und Zellneubildung in einem definierbaren Verhältnis stehen. Die Untersuchungen wurden in verschiedenen Abschnitten der Oralmucosa der Maus durchgeführt.

In Serienschnitten der Gingiva entspricht nur das der Oral-mucosa angrenzende sogenannte "Outer Gingival Epithel" diesem Schema. EA und DE zeigen einen eigenen Rhythmus.

Wie beschrieben, ist in dieser Arbeit die Regenerationszeit von EA und DE sehr genau untersucht worden. Der "Migrationsvorgang" wurde in kurzen Zeitabständen und zum Teil mit Hilfe von Messungen verfolgt und rekonstruiert (s. halbschematische Abb. 19).

Die Regeneration des EA beträgt etwa 70 Stunden, die des DE etwas länger (zwischen 80 und 90 Stunden). Die Befunde nähern sich denen von BEAGRIE und SKOUGAARD (1962) gefundenen.

Die genannten Autoren fanden für das EA eine Erneuerungszeit von 3-5 Tagen. Allerdings sehen sie die Erneuerungszeit erst dann als beendet an, wenn "the last fully labeled cell to be lost from the surface layer". KIRSCHNER und ich konnten unabhängig voneinander "vollmarkierte" Zellen dann noch im Gewebe beobachten, wenn der Hauptanteil der ersten Zellmigrationswelle längst das Stratum corneum erreicht hatte.

F. Zusammenfassung

Zellneubildung und Zellmigration in der Molarengingiva der Maus wurden unter Verwendung von ^3H -Thymidin autoradiographisch verfolgt.

1. Die Zellneubildung in der Gingiva der Maus findet im Stratum basale statt.
2. Parodontales Bindegewebe weist eine wesentlich geringere Zellneubildungsrate als Gingivaepithel auf.
3. Die Zellneubildung verläuft in den Gingivaarealen EA, DE und OGE über 24 Stunden (signifikant) rhythmisch.
4. Der Zellneubildungsrhythmus verhält sich in den drei Gingivaabschnitten (signifikant) unterschiedlich.
5. "Hartfüttertiere" weisen in den genannten Arealen um 20 Uhr höchste, um 8 Uhr niedrigste Zellneubildungsaktivität auf.
6. Die Zellneubildung im OGE zeigt in beiden Versuchsreihen (Hartfutter-Weichfutter) einen ähnlichen Tag- Nachtrhythmus wie er von KIRSCHNER (1968) für die Oralmucosa gefunden wurde. DE und EA weichen von diesem Rhythmus deutlich ab.
7. Die Zellneubildungsraten sind in den Gingivaarealen (signifikant) verschieden hoch.
8. "Weichfutter" hat (signifikant) Einfluß auf den zeitlichen Verlauf der Zellneubildung.
9. Die mittleren Zellneubildungsraten im DE und OGE liegen bei "Weichfüttertieren" niedriger (ebenso in Oralmucosa: (KIRSCHNER, 1968)) im EA dagegen höher (s. Abb. 17). Der Einfluß von Futterkonsistenz auf die Zellneubildung der Gingiva ist jedoch statistisch nicht signifikant.

10. Eine auffallend starke Zellneubildungskonzentration ist im unteren, dem EA angrenzenden Basalabschnitt des DE bei beiden Fütterungsarten festzustellen.
11. Besonderheiten der Zellmigration für Gingivaepithel werden aufgezeigt.
12. Die Regenerationszeit des Epithelialen Attachments beträgt etwa 65 Stunden.
13. Die Migrationsgeschwindigkeit ist im Epithelialen Attachment wesentlich höher als in anderen Gingivaabschnitten und Oralmucosa.

G. Literatur

- ANDERSON, G.S.
STERN, I.B. The Proliferation and Migration of
the Attachment Epithelium on the
cemental surface of the rat incisor.
Periodontics Vol. 4, 3, (1961)
- BEAGRIE, G.S. Observation on cell biology of gingival
tissues of mice.
Brit. Dent. J. 121, 417-420 (1966)
- BEAGRIE, G.S. An autoradiographic study of the
gingival epithelium of mice and monkeys
with thymidine- H^3 .
Dent. Prakt. 14, 18-26 (1963)
- BEAGRIE, G.S.
SKOUGAARD, M.R. Life cycle of gingival epithelial cells.
Dental Abstract, 8, 502-503 (1963)
- BEAGRIE, G.S. Observations on the life cycle of the
gingival epithelial cells of mice
revealed by autoradiography.
Acta odont. Scand. 20, 15-31 (1962)
- BERTALANFFY, F. a) Aspects of cell formation and ex-
foliation related to cytodiagnosis.
Acta Cytol. 6, 132 (1963)
- BERTALANFFY, F. b) Cell renewal as the basis of diagnostic
exfoliative cytology.
Am. J. Abst. Gynec. 1, 338-396 (1963)
- BERTALANFFY, F,
LAU, Ch. Cell renewal.
Int. Rev. Cytol. 13, 357 (1962)
- BRILL, N.
BRÖNNESTAM, R. Immunoelktrophoretic study of tissue
fluid from gingival pockets.
Acta odont. scand. 18, 95 (1960)
- BRILL, N.
KRASSE, B. The passage of tissue fluid into the
clinically healthy gingival pocket.
Acta odont. scand. 16, 233 (1958)
- BULLOUGH, W.S. Stress and epidermal mitotic activity.
The effects of the adrenal hormones.
J. Endocrinol. 8, 265-274 (1952)

- BULLOUGH, W.S. The effect of high and low temperatures on the epidermal mitotic activity of the adult male mouse, *mus musculus* L.
J. Exper. Biol. 26, 76 (1949)
- BURCK, H.Ch. Histologische Technik
Thieme, Stuttgart (1965)
- GARNEY, R.W.
MOTT, N.F. zitiert nach K.SCHMEISER:
Radionucleotide, (Autoradiographie, S. 193) Springer (1963)
- GREULICH, H.C. Epithelial DNA and RNA synthetic activities of the gingival margin.
J. of Dental Res. 40, 682 (1961)
- HANSEN, E.R. Mitotic activity and cell densities in gingival epithelium of rats.
Särtryck ur Odont. Tidskrift 75, 1 (1967)
- HANSEN, E.R. Mitotic activity of the gingival epithelium in colchicized rats.
Särtryck ur Odont. Tidskrift 3, (1966)
- HARTL, St. Die 24-Std.-Periodik der mitotischen Aktivität und der Rundzelleninfiltration im Epithel der Interdentalspapille der Ratte.
Med. Diss., Zürich (1956)
- HARVEY, P.M. zitiert nach G.S. BEAGRIE:
An autoradiographic study of the gingival epithelium of mice and monkeys with thymidine- H^3 .
Dent. Prakt. 14, 18-26 (1963)
- HIRTH, Ch.M.
HARTL, St.
MÜHLEMANN, H.R. The distribution of mitosis in the epithelium of the interdental papillae of the rat molar.
J. Periodont. 26, 229-234 (1955)
- HUGHES, W.L. Autoradiography with tritium: the duplicating mechanism of chromosomes and the chronology of events related to nucleic acid synthesis.
Proc. 2nd. Int. Conf. on Peaceful uses of Atomic Energy 25, 203-210 (1959)

- JOFTES, D.L. Liquid emulsion autoradiography with tritium.
Lab. Invest. 8, 131-138 (1959)
- JOFTES, D.L. Simplified liquid emulsion
WARREN, Sh. radioautography.
J. Periodont. 35, 375-380 (1955)
- JOGLEKAR, A.A. Cytological study of the Migration
TOTO, P.D. of the Epithelial Cells of the Mouse
GARGIULO, A.W. Interdental Papillae.
J. Periodont. 35, 375 (1964)
- KIRSCHNER, H. Autoradiographische Untersuchungen
Über die Regeneration der Mund-
schleimhaut.
Med. Habil.-schrift, Giessen (1968)
- KIRSCHNER, H. a) Zellneubildung der Mundschleim-
haut.
Naturwissensch. 54, 255 (1967)
- KIRSCHNER, H. b) Tageszeitlich variable Strepto-
kokkenbesiedlung der Mundschleimhaut.
Dtsch. Zahnärztl. Z. 22, 151 (1967)
- KIRSCHNER, H. c) Beeinflussung der Zellneubildung
in der Mundschleimhaut.
Dtsch. Zahnärztl. Z. 22, 1560 (1967)
- KIRSCHNER, H. Autoradiographische Untersuchungen mit
RÜHL, E. ^3H -Thymidin über die Regeneration des
epithelialen Attachments.
Dtsch. Zahnärztl. Z. 24, 816-824 (1969)
- LEBLOND, C.P. Relationship of cell formation and cell
GREULICH, R.C. migration in the renewal of stratified
PEREIRA, J.P. squamous epithelia.
Adv. in Biology of Skin 5, 39-67 (1964)
- LEBLOND, C.P. Thymidine- H^3 as a tool for the in-
MESSIER, B. vestigation of the renewal of cell popu-
KOPRIWA, B. lations.
Labor. Invest. 8, 296-308 (1959)
- MEYER, J. Mitotic rate of gingival epithelium in
MARWAH, A.S. two age groups.
WEINMANN, J.D. The J. of Invest. Derm. 27, 237-247 (1956)

- MÜHLEMANN, H.R.
HARTL, S. Daily variations of mitosis and inflammatory cell migration in the epithelium of the intermolar papillae in rats.
Bull. Acad. suisse sc. med. 11, 378 (1955)
- OEHLERT, W. Die Steuerung der Regeneration im mehrschichtigen Plattenepithel.
Verh. der Dtsch. Ges. f. Path. 50. Tgg. 99-118 (1966)
- ORBAN, J.B. Orban's oral histology and embryology (Harry Sicher).
Mosby (1962)
- QUASTLER, H. Cell population kinetics.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 580 (1960)
- QUASTLER, H.
SHERMAN, F.G. Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse.
Exp. Cell. Res. 17, 420 (1959)
- ROGERS, A.W. Techniques of autoradiography.
Elsevier Publishing Co., London (1967)
- ROLSHOVEN, E. Eine Kritik der Zellteilungslehre als Schlüssel zum Krebsproblem.
Die Med. Welt 50, 1567-1590 (1951)
- SCHMEISER, K. Radionucleotide (Autoradiographie, p. 194). Springer (1963)
- SCHULZE, B.
OEHLERT, W. Autoradiographic investigations of incorporation of ^3H -thymidine into cells of rat and mouse.
Science 131, 737-738 (1960)
- TAYLOR, J.H. Autoradiography with tritium- labeled substances.
Arch. biol. med. Phys. 7, 107-130 (1960)
- TAYLOR, J.H. The mode of chromosomes duplication in crepsis capillaris.
Exper. Cell. Res. 15, 350 (1958)

- TROTT, J.R.
GORENSTEIN, S.L. Mitotic rates in the oral and gingival
epithelium of the rat.
Arch. Oral.Biol. 8, 425-834 (1963)
- WAERHAUG, J. The gingival pocket .
Odont. Tidskr. 60, 60 Suppl. 1, (1952)
- WALKER, B.E. Renewal of cell populations in the
female mouse.
Am. J. Anat. 107, 95-102 (1960)
- WINER, B.J. Statistical principles in experimental
design.
New York (1962)
- YOUNG, G.W. Mitotic activity in the oral epithelium
of the female rat.
J. periodont. Res. 3, 51-62 (1968)

Lebenslauf

Am 30.9.1941 wurde ich als Sohn des Zahnarztes Heinrich Rühl und seiner Ehefrau Emilie geb. Weller in Giessen geboren. Ich besuchte ab Herbst 1947 die Grundschule in Großen-Buseck, anschließend die Herderschule in Giessen. Dort legte ich im März 1963 die Reifeprüfung ab.

Ich begann daraufhin das Studium der Zahnheilkunde an der Johann Wolfgang Goethe - Universität in Frankfurt. 1966 bestand ich dort das Physikum und im Februar 1969 das Staatsexamen.

Vom 1. März 1969 bis 28. Februar 1970 war ich in der Prothetischen Abteilung des Zahnärztlichen Universitätsinstitutes "Carolinum" als Assistent tätig und vertrat daraufhin zwei Monate meinen Vater in dessen Praxis.

Seit 1. April bin ich als Wehrpflichtiger bei der Bundeswehr und übe seit 1. Mai 1970 in der Zahnärztlichen Station des Bundeswehrkrankenhauses Giessen meinen Beruf aus.

Von Herrn Prof. Dr. H. Kirschner wurde mir im März 1967 die Möglichkeit gegeben, im Zahnärztlichen Institut der Justus Liebig - Universität tierexperimentell zu arbeiten.

